

**Identifizierung von Interaktionspartnern
des *response* Regulators RegA aus
*Rhodobacter capsulatus***

-

**Die Rolle der Interaktion von RegA und NtrX bei der
Regulation von Photosyntheseogenen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Jutta Gregor

aus
Langgöns-Niederkleen

angefertigt im Institut für Mikro- und Molekularbiologie
Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften
Justus Liebig Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Klug

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz

If you perceive that there are four possible ways in which a procedure can go wrong, and circumvent these, then a fifth way, unprepared for, will promptly develop.

Murphy's 6th law

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | SIGNALTRANSDUKTION DURCH PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN | 1 |
| 1.2 | AUFBAU BAKTERIELLER ZWEIKOMPONENTENSYSTEME..... | 2 |
| 1.2.1 | <i>Sensorkinasen</i> | 3 |
| 1.2.2 | <i>Response Regulatoren</i> | 4 |
| 1.3 | REGULATION DER EXPRESSION VON PHOTOSYNTHESEGEGENEN BEI <i>RHODOBACTER CAPSULATUS</i> | 6 |
| 1.3.1 | <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 6 |
| 1.3.2 | <i>Aufbau und Funktion des Photosyntheseapparates von Rhodobacter capsulatus</i> | 7 |
| 1.3.3 | <i>Das RegB/RegA-Zweikomponentensystem</i> | 10 |
| 1.3.4 | <i>Photosynthese-Gencluster in R. capsulatus</i> | 15 |
| 1.3.5 | <i>Transkriptionelle Regulation von Photosyntheseegenen bei Rhodobacter</i> | 16 |
| 1.3.5.1 | <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 17 |
| 1.3.5.2 | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | 19 |
| 1.4 | ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 22 |
| 2 | MATERIAL | 24 |
| 2.1 | CHEMIKALIEN | 24 |
| 2.2 | ENZYME..... | 25 |
| 2.3 | MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZENSÄTZE | 25 |
| 2.4 | MATERIAL FÜR DIE SÄULENCHROMATOGRAPHIE..... | 25 |
| 2.5 | RADIOAKTIV MARKIERTE STOFFE | 26 |
| 2.6 | ANTIKÖRPER..... | 26 |
| 2.7 | GRÖßENSTANDARDS | 26 |
| 2.8 | ANTIBIOTIKA | 26 |
| 2.9 | STÄMME | 26 |
| 2.9.1 | <i>E. coli</i> | 26 |
| 2.9.2 | <i>R. capsulatus</i> | 27 |
| 2.9.3 | <i>S. cerevisiae</i> | 27 |
| 2.10 | PLASMIDE | 27 |
| 2.11 | OLIGONUKLEOTIDE..... | 31 |
| 2.12 | PUFFER | 36 |
| 2.12.1 | <i>Enzympuffer</i> | 36 |
| 2.12.2 | <i>Auftragspuffer</i> | 36 |
| 2.12.3 | <i>Puffer für die Säulenchromatographie</i> | 37 |
| 2.12.3.1 | <i>Puffer zum Zellaufschluss für Ni-NTA-Affinitätschromatographie</i> | 37 |
| 2.12.3.2 | <i>Puffer für die Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie</i> | 37 |
| 2.12.3.3 | <i>Puffer für die Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie</i> ... | 37 |
| 2.12.4 | <i>Elektrophorese-Puffer, blot-Puffer, Elutionspuffer</i> | 38 |
| 2.13 | MEDIEN | 38 |
| 2.14 | GERÄTE UND WEITERES MATERIAL | 41 |
| 3 | METHODEN..... | 42 |
| 3.1 | MIKROBIOLOGISCHE METHODEN..... | 42 |
| 3.1.1 | <i>Plattenkulturen von E. coli</i> | 42 |
| 3.1.2 | <i>Flüssigkulturen von E. coli</i> | 42 |
| 3.1.3 | <i>Fermenteranzucht von E. coli</i> | 42 |
| 3.1.4 | <i>Plattenkulturen von R. capsulatus</i> | 42 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.1.5 | <i>Flüssigkulturen von R. capsulatus</i> | 43 |
| 3.1.5.1 | Aerobes Wachstum | 43 |
| 3.1.5.2 | Semiaerobes Wachstum | 43 |
| 3.1.5.3 | Phototrophes Wachstum | 43 |
| 3.1.6 | <i>Plattenkulturen von S. cerevisiae</i> | 43 |
| 3.1.7 | <i>Flüssigkulturen von S. cerevisiae</i> | 43 |
| 3.1.8 | <i>Bestimmung der Gesamtzellzahl von Kulturen</i> | 44 |
| 3.1.9 | <i>Herstellung von Dauerkulturen</i> | 44 |
| 3.1.10 | <i>Herstellung von kompetenten E. coli-Zellen zur Elektroporation</i> | 44 |
| 3.1.11 | <i>Elektroporation von E. coli</i> | 45 |
| 3.1.12 | <i>Herstellung von kompetenten E. coli-Zellen zur Hitzeschock-Transformation</i> | 45 |
| 3.1.13 | <i>Hitzeschock-Transformation von E. coli</i> | 46 |
| 3.1.14 | <i>Herstellung von kompetenten S. cerevisiae zur Transformation</i> | 46 |
| 3.1.15 | <i>Transformation von S. cerevisiae</i> | 47 |
| 3.1.16 | <i>Mating von S. cerevisiae</i> | 48 |
| 3.1.17 | <i>Konjugation von Plasmiden nach R. capsulatus</i> | 49 |
| 3.1.18 | <i>Gesamtzell-Absorptions-Spektren von R. capsulatus</i> | 50 |
| 3.1.19 | <i>Zellfreie Extrakte von R. capsulatus</i> | 50 |
| 3.1.20 | <i>In vivo ³⁵S-Methionin Markierung von Proteinen in R. capsulatus</i> | 51 |
| 3.1.21 | <i>Überexpression von Fremdprotein in E. coli</i> | 51 |
| 3.2 | ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN | 52 |
| 3.2.1 | <i>Plasmidisolierung</i> | 52 |
| 3.2.1.1 | Minipräparation | 52 |
| 3.2.1.2 | Plasmid-Midipräparation | 52 |
| 3.2.1.3 | Megapräparation | 53 |
| 3.2.1.4 | Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> | 53 |
| 3.2.2 | <i>Präparation genomischer DNA aus R. capsulatus</i> | 53 |
| 3.2.3 | <i>Phenol/Chloroformextraktion</i> | 54 |
| 3.2.4 | <i>Ethanolpräzipitation</i> | 54 |
| 3.2.5 | <i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i> | 54 |
| 3.2.6 | <i>Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen</i> | 55 |
| 3.2.7 | <i>Herstellung von einzelsträngiger Carrier-DNA zur Hefetransformation</i> | 55 |
| 3.3 | ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN | 56 |
| 3.3.1 | <i>DNA-Restriktionsspaltung</i> | 56 |
| 3.3.2 | <i>Dephosphorylierung von Nukleinsäuren</i> | 56 |
| 3.3.3 | <i>Ligation von DNA</i> | 57 |
| 3.3.4 | <i>Radioaktive Markierung eines PCR-Produkts</i> | 58 |
| 3.3.5 | <i>Aufreinigung eines radioaktiv markierten PCR-Produkts</i> | 58 |
| 3.4 | BIOCHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE METHODEN | 59 |
| 3.4.1 | <i>Gelelektrophorese</i> | 59 |
| 3.4.1.1 | Agarosegele zur DNA-Analyse | 59 |
| 3.4.1.2 | SDS-Polyacrylamidgele | 59 |
| 3.4.1.3 | Polyacrylamidgele zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente | 60 |
| 3.4.1.4 | Native Polyacrylamidgele für Gelretardations-assays | 61 |
| 3.4.1.5 | Polyacrylamidgele für 2D-Gelelektrophorese | 61 |
| 3.4.1.6 | Silberfärbung von Polyacrylamidgelen | 62 |
| 3.4.2 | <i>Nachweis radioaktiver Reaktionsprodukte</i> | 63 |
| 3.4.2.1 | Autoradiographie | 63 |
| 3.4.2.2 | Phospho Imaging | 63 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4.3 | Konzentrationsbestimmung bei Proteinlösungen | 63 |
| 3.4.4 | Phosphorylierung von Proteinen | 64 |
| 3.4.5 | Dephosphorylierung von Proteinen | 64 |
| 3.4.6 | Western Analyse von Proteinen (Westernblot) | 65 |
| 3.4.7 | In vitro Transkription/in vitro Translation | 66 |
| 3.4.8 | Zellaufschlussmethoden | 67 |
| 3.4.8.1 | Aufschluss bakterieller Zellen zur Ni-NTA-Affinitätschromatographie | 67 |
| 3.4.8.2 | Aufschluss bakterieller Zellen zur Glutathion-Affinitätschromatographie | 67 |
| 3.4.9 | Gelretardations-assay | 67 |
| 3.4.10 | GST-pulldown-assay | 68 |
| 3.4.11 | 2D-Gelelektrophorese | 70 |
| 3.5 | SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE METHODEN | 72 |
| 3.5.1 | Ni-NTA-Affinitätschromatographie | 72 |
| 3.5.2 | Glutathion-Affinitätschromatographie | 73 |
| 3.5.3 | Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie | 74 |
| 3.6 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 74 |
| 3.6.1 | PCR | 74 |
| 3.6.2 | In situ PCR | 75 |
| 3.6.3 | DNA-Sequenzierung | 76 |
| 3.6.4 | Southern Analyse von DNA | 76 |
| 3.6.5 | Qualitativer Filter β -Galaktosidase-assay bei <i>S. cerevisiae</i> | 79 |
| 3.6.6 | Quantitativer β -Galaktosidase-assay bei <i>S. cerevisiae</i> | 80 |
| 3.6.7 | β -Galaktosidase-assay bei <i>E. coli</i> und <i>R. capsulatus</i> | 81 |
| 4 | ERGEBNISSE | 82 |
| 4.1 | UNTERSUCHUNG VON REGA UND REGA* IM 2-HYBRIDSYSTEM | 82 |
| 4.1.1 | Theoretischer Überblick | 82 |
| 4.1.2 | Untersuchung der Interaktion von RegA und RegA* mit RegB im Hefe 2-Hybridsystem | 83 |
| 4.1.3 | Suche nach Proteinen, die mit RegA und RegA* im 2-Hybridsystem interagieren | 85 |
| 4.1.3.1 | Herstellung einer Genbank von <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 86 |
| 4.1.3.2 | Suche nach Interaktionspartnern von RegA mit Hilfe des 2-Hybridsystems | 88 |
| 4.1.3.3 | Suche nach Interaktionspartnern von RegA* mit Hilfe des 2-Hybridsystems | 94 |
| 4.2 | INTERAKTION VON REGA MIT DEM RESPONSE REGULATOR NTRX | 96 |
| 4.2.1 | Charakterisierung von NtrX in vivo | 96 |
| 4.2.1.1 | Deletion von ntrX bei <i>R. capsulatus</i> | 96 |
| 4.2.1.2 | Charakterisierung der NtrX-Deletionsmutante | 98 |
| 4.2.1.3 | Bakteriochlorophyll-Gehalt von NtrX-Mutanten | 104 |
| 4.2.1.4 | Komplementation der <i>R. capsulatus</i> NtrX-Mutanten | 105 |
| 4.2.1.5 | Überexpression von NtrX in <i>R. capsulatus</i> | 107 |
| 4.2.1.6 | Deletion von NtrX in <i>R. capsulatus</i> Δ RRC6 | 109 |
| 4.2.1.7 | Charakterisierung der <i>R. capsulatus</i> Δ RRC6 Δ NtrX-Mutante | 110 |
| 4.2.2 | Charakterisierung der Interaktion von NtrX und RegA in vitro | 112 |
| 4.2.2.1 | Aufreinigung von His ₆ -RegA aus <i>E. coli</i> | 112 |
| 4.2.2.2 | Aufreinigung von GST-NtrX aus <i>E. coli</i> | 113 |
| 4.2.2.3 | Gelretardationsexperimente mit dem puf-Promotor | 114 |

| | | |
|---------|--|------------|
| 4.2.2.4 | Gelretardationsexperimente mit <i>puc</i> -Promotor | 116 |
| 4.2.2.5 | Phosphorylierung und Mutagenese von GST-NtrX..... | 117 |
| 4.2.2.6 | Gelretardationsexperimente mit der <i>puc</i> - und der <i>puf</i> Promotorregion | 119 |
| 4.2.2.7 | Untersuchung des Laufverhaltens von GST-NtrX im nativen PAA-Gel | 120 |
| 4.2.2.8 | GST-pulldown-assay | 121 |
| 4.2.3 | 2D-gelelektrophoretische Untersuchungen verschiedener <i>R. capsulatus</i> Stämme | 123 |
| 4.3 | INTERAKTION VON REGA MIT ANFD UND NIFN..... | 128 |
| 4.3.1 | Untersuchung von BchB im 2-Hybridsystem..... | 128 |
| 4.3.1.1 | Klonierung von BchB aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 128 |
| 4.3.1.2 | Untersuchung von BchB und RegA im Hefe 2-Hybridsystem..... | 129 |
| 4.3.1.3 | Klonierung der N-terminalen Domäne aus BchB..... | 129 |
| 4.3.1.4 | Untersuchung der Interaktion der BchB-Domäne mit RegA im 2-Hybridsystem..... | 129 |
| 4.3.2 | Untersuchung verschiedener Untereinheiten der Nitrogenase und nitrogenaseähnlicher Proteine im 2-Hybridsystem | 129 |
| 4.3.2.1 | Klonierung der Gene aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> für das 2-Hybridsystem..... | 130 |
| 4.3.2.2 | Untersuchung der Interaktion von Nitrogenase-Untereinheiten und nitrogenase-ähnlichen Proteinen mit RegA im 2-Hybridsystem | 130 |
| 4.4 | UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTIONSREGULATION DES <i>PUC</i> -PROMOTORS IN <i>E. COLI</i> | 131 |
| 4.4.1 | Theorie..... | 131 |
| 4.4.2 | Klonierung | 131 |
| 4.4.3 | <i>puc</i> -Promotor Aktivität | 133 |
| 5 | DISKUSSION..... | 135 |
| 5.1 | UNTERSUCHUNG VON REGA UND REGA* IM HEFE 2-HYBRIDSYSTEM..... | 135 |
| 5.1.1 | Untersuchung der Interaktion von RegB mit RegA und RegA*..... | 136 |
| 5.1.2 | Identifizierung von Interaktionspartnern von RegA | 137 |
| 5.1.3 | Identifizierung von Interaktionspartnern von RegA* | 141 |
| 5.2 | INTERAKTION VON REGA MIT DEM RESPONSE REGULATOR NTRX..... | 142 |
| 5.2.1 | Charakterisierung von NtrX in vivo..... | 143 |
| 5.2.2 | Charakterisierung der Interaktion von NtrX und RegA in vitro..... | 146 |
| 5.2.3 | 2D-gelelektrophoretische Untersuchung verschiedener <i>R. capsulatus</i> Stämme | 149 |
| 5.2.4 | Modell für die Interaktion von NtrX und RegA..... | 152 |
| 5.3 | INTERAKTION VON REGA MIT ANFD UND NIFN..... | 154 |
| 5.3.1 | Untersuchung von BchB im 2-Hybridsystem..... | 155 |
| 5.3.2 | Untersuchung verschiedener Untereinheiten der Nitrogenase und nitrogenase-ähnlicher Proteine im Hefe 2-Hybridsystem | 157 |
| 5.4 | UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTIONSREGULATION DES <i>PUC</i> -PROMOTORS IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 158 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 161 |
| 7 | LITERATUR..... | 163 |
| 8 | ANHANG..... | 174 |
| 8.1 | ABKÜRZUNGEN..... | 174 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 8.2 | GESAMTÜBERSICHT ALLER PROTEINE, DIE EINE INTERAKTION MIT REGA IM 2-HYBRIDSYSTEM ZEIGTEN | 177 |
|-----|---|-----|

1 EINLEITUNG

Alle Lebewesen sind einer Vielzahl verschiedener Umweltfaktoren ausgesetzt. Um in dieser sich stetig wandelnden Umgebung überleben zu können, müssen alle Organismen in der Lage sein, ihre Stoffwechselfunktionen den jeweiligen Bedingungen anzupassen. Faktoren wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff, aber auch Temperatur, pH-Wert und Licht nehmen direkten Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung der Organismen. Im Tier- und Pflanzenreich gibt es zahllose Beispiele dafür, dass Zellen auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren können. Bei Pflanzen spielt beispielsweise die Lichtintensität eine entscheidende Rolle bei der Blattdifferenzierung. Auch die Zellen von Säugetieren sind in der Lage, geänderte Umgebungsbedingungen wahrzunehmen und darauf zu reagieren. So führt Nahrungsmangel und dichte Besiedelung innerhalb einer Petrischale beispielsweise dazu, dass manche Zellkulturen ihr Wachstum einstellen. Nach Zugabe sogenannter Wachstumsfaktoren lässt sich hier eine verstärkte Zellvermehrung beobachten (Knippers, 1997; pp 329-330).

Besonders drastisch wirken sich Veränderungen in der Umwelt auf einzellige Organismen aus. Solche Organismen stehen mit ihrer gesamten Oberfläche in ständigem Kontakt zu ihrer Umgebung und müssen sich den gegebenen Bedingungen daher schnell anpassen. Andernfalls kann es zur Schädigung der Zelle und somit dem Tod des gesamten Mikroorganismus kommen. Umweltveränderungen werden über verschiedene Sensorproteine (Rezeptoren) der Zellen wahrgenommen. Die Aktivierung dieser Proteine führt dann zur Weiterleitung des entsprechenden Signals an sogenannte Effektorproteine. Diese können dann auf verschiedenen Ebenen die Anpassung des Organismus an die entsprechende Situation bewirken. Zum einen kann die Neusynthese von Proteinen reguliert werden; dies kann beispielsweise auf Ebene der Transkription, also der mRNA-Synthese, oder auch auf Ebene der Translation, also der Proteinsynthese, geschehen. Auch eine Modifikation der fertigen Proteine kann die Aktivität bzw. Stabilität dieser Moleküle beeinflussen.

1.1 Signaltransduktion durch Phosphorylierung von Proteinen

In den meisten Fällen geschieht die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle durch Modifikation von Proteinen. Eine der häufigsten Protein-Modifikationen innerhalb der Signaltransduktion, sowohl von Prokaryoten, als auch von Eukaryoten, ist die Phosphorylierung. Eukaryoten nutzen hauptsächlich die Aminosäuren Serin, Threonin

und Tyrosin zur Phosphorylierung, wohingegen bei bakteriellen Kinasen die Phosphorylierung von Histidinen favorisiert wird (Kennelly und Potts, 1996). Funktionell sind die Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen den Histidinkinasen sehr ähnlich, allerdings existieren auch entscheidende Unterschiede zwischen diesen Proteingruppen. So wird im Falle einer Serin-, Threonin- oder Tyrosinkinase bei der Phosphorylierung eine Phosphoester-Bindung geknüpft. Histidinkinasen dagegen werden über die Bildung einer Phosphoramidat-Bindung phosphoryliert. Phosphoesterbindungen haben ein Phosphotransfer-Potenzial, dass unter dem von MgATP liegt, deshalb ist diese Art der Phosphorylierung irreversibel (Übersicht in Stock *et al.*, 1995). Die Phosphatgruppe kann nur durch eine entsprechende Phosphatase abgespalten werden. Daher kommt es bei eukaryotischer Signaltransduktion zu einem Wechselspiel zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (Übersicht in Hunter, 1995). Bei Histidin-Kinasen ist die Phosphorylierung ein reversibler Prozess, da das Phosphotransfer-Potenzial der Phosphoramidat-Bindung höher ist als das von MgATP (Übersicht in Stock *et al.*, 1995). Trotz dieser Reversibilität ist auch die Histidin-Phosphorylierung ein gerichteter Prozess. Zur Dephosphorylierung wird auch hier eine Phosphatase benötigt. Allerdings dient in prokaryotischen Systemen meist die Histidin-Proteinkinase selbst als Phosphatase.

Eukaryotische Signaltransduktion geschieht häufig innerhalb sogenannter Signalkaskaden. Hierbei wird die Phosphorylierung von einer Kinase auf eine weitere Kinase übertragen. Nach einer Reihe zwischengeschalteter Proteinkinasen wird die Phosphorylierung dann zur spezifischen Regulation von Zielproteinen genutzt (u.a. Liebmann, 2001).

Kinasen spielen auch bei der Signaltransduktion von Prokaryoten eine große Rolle. In vielen Fällen werden Umweltsignale über sogenannte Zweikomponentensysteme wahrgenommen. Die Aufnahme eines externen Signals führt zur Autophosphorylierung einer meist membrangebundenen Sensorkinase unter Verwendung von ATP. Durch Weiterleitung der Phosphorylierung an einen *response* Regulator wird dieser beispielsweise zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen befähigt.

1.2 Aufbau bakterieller Zweikomponentensysteme

Zweikomponentensysteme bestehen, wie ihr Name bereits impliziert, aus zwei Einzelkomponenten, der Sensorkinase und dem *response* Regulator. Diese Systeme sind in der Lage, Signale innerhalb der Zelle weiterzuleiten. Das einkommende Signal aus

der Umgebung wird durch die Sensorkinase aufgenommen und führt zur Autophosphorylierung des Proteins. Anschließend überträgt die Sensorkinase den Phosphatrest auf den korrespondierenden *response* Regulator. Die Phosphorylierung des *response* Regulators ermöglicht dann die spezifische Regulation von Zielgenen. In Organismen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Synechocystis spec.* wurden 30 bis 40 verschiedene Zweikomponentensysteme identifiziert, wobei jedes einzelne System auf unterschiedliche Signale anspricht und daraufhin bestimmte Gene aktiviert (Hoch und Varughese, 2001). Zum ersten Mal wurde ein *response* Regulator (CheY) 1985 von Stock *et al.* identifiziert. Der Mechanismus eines Zweikomponentensystems wurde erstmals 1986 von Nixon *et al.* beschrieben. Anfangs war diese Art der Signaltransduktion nur für Prokaryoten bekannt. Inzwischen wurden Zweikomponentensysteme auch bei eukaryotischen Organismen entdeckt (Brown und Firtel, 1998). Eine Erweiterung der klassischen Zweikomponentensysteme stellen die sogenannten *phosphorelay* Systeme dar. Eine *phosphorelay* Signaltransduktionskaskade wurde beispielsweise bei der Einleitung der Sporulation von *B. subtilis* identifiziert. Eine Phosphatgruppe wird von einer Sensorkinase (KinA, KinB oder KinC) auf ein Aspartat im *response* Regulator Spo0F übertragen. Spo0F dient als Phosphodonor und transferiert die Phosphatgruppe dann auf ein Histidin in Spo0B. Spo0B kann dann schließlich das Phosphat auf ein Aspartat in Spo0A, dem letzten Protein der Signalkaskade, übertragen (Appleby *et al.*, 1996). Meist werden *phosphorelay* Systeme zur Regulation solcher Prozesse eingesetzt, die zu gravierenden Änderungen innerhalb der Zelle führen, wie beispielsweise die Sporulation von *B. subtilis* (Appleby *et al.*, 1996).

1.2.1 Sensorkinasen

Die bereits oben angesprochenen Sensorkinasen können auf Grund eines externen Signals, sei es direkt aus der Umgebung aufgenommen, oder von anderen Proteinen übertragen, ihre Autophosphorylierung einleiten (Übersicht in Stock *et al.*, 1995). Die phosphorylierte Aminosäure innerhalb der Sensorkinase ist ein konserviertes Histidin, weshalb diese Proteine auch Histidin-Protein-Kinasen genannt werden. Für Histidin-Protein-Kinasen ist eine konservierte Sequenz von etwa 200 Aminosäuren charakteristisch. Dieser Bereich enthält eine Domäne, die ATP binden kann, und die die Phosphorylierung des Histidins katalysiert. Flankiert wird dieser Abschnitt des Proteins von anderen Domänen, die bei Vergleich mehrerer Histidin-Kinasen keine Homologie

zeigen. Diese Bereiche dienen der regulatorischen Funktion des Proteins und sind somit spezifisch für das jeweilige Signal, das die Kinase empfängt. Viele Histidin-Protein-Kinasen haben eine erweiterte N-terminale Domäne mit ausgedehnten Bereichen von hydrophoben Aminosäuren. Dieser Teil dient zur Verankerung des Proteins innerhalb der Cytoplasmamembran. Einige dieser Transmembran-Kinasen haben eine externe Sensor-Domäne, die sie zur Aufnahme eines Signals an der Zelloberfläche befähigt. Die Aufnahme des für die Histidin-Kinase spezifischen Signals führt zur Autophosphorylierung des Proteins. In allen bisher untersuchten Fällen konnte die Histidin-Phosphorylierung als bimolekulare Reaktion identifiziert werden. Ein intramolekularer Mechanismus ist nicht beschrieben. Bei der Autophosphorylierung kommt es vielmehr zur Bildung eines Homodimers der Kinase. Die Phosphorylierung des Histidins eines Kinase-Monomers wird durch ein zweites Monomer des Proteins katalysiert. Histidin-Protein-Kinasen können sich in ihrer Struktur stark unterscheiden. So tragen einige der Proteine, wie bereits erwähnt, eine Membranankerdomäne, andere, wie NtrB, sind wiederum cytoplasmatische Proteine. Es ist auch möglich, dass die Kinase bereits eine integrierte *response* Regulator Domäne enthält, wie zum Beispiel für FrzE beschrieben (Übersicht in Stock *et al.* 1995). In diesem Fall ist eine Übertragung der Phosphatgruppe auch auf ein internes Aspartat in der *response* Regulator Domäne möglich.

1.2.2 Response Regulatoren

Response Regulatoren werden in vier verschiedene Familien eingeteilt (Übersicht in Stock *et al.*, 1995; Volz *et al.*, 1995). Diese Familien erhielten ihre Namen aus historischen Gründen nach den zuerst identifizierten Proteinen aus der jeweiligen Familie. Die vier verschiedenen Gruppen wurden CheY-, NtrC-, FixJ- und OmpR-Familie genannt. Die CheY-Familie beinhaltet die *response* Regulatoren, die nur aus einer einzigen Domäne bestehen. Alle übrigen *response* Regulatoren sind aus mehreren Domänen aufgebaut. Die meisten *response* Regulatoren sind Transkriptionsregulatoren. Sie enthalten in der carboxyterminalen Domäne ein DNA-Bindemotiv, das sie zur Interaktion mit DNA befähigt. CheY trägt keine solche DNA-Bindungsregion. Dieses Regulatorprotein empfängt innerhalb des Chemotaxisystems ein Phosphat von der korrespondierenden Sensorkinase CheA. Durch die Phosphorylierung kann CheY mit dem Motor des Flagellums in *E. coli* Kontakt aufnehmen und dadurch die Schwimmbewegung des Bakteriums beeinflussen. Ein anderer *response* Regulator aus

dem Chemotaxisystem ist CheB. Dieses Protein dient zur Demethylierung von membrangebundenen Chemorezeptoren. Deshalb trägt die Aktivator-domäne von CheB ebenfalls kein DNA-Bindungsmotiv, sondern stattdessen eine katalytische Domäne, die die Demethylierung der Chemorezeptoren bewirken kann. Auf Grund der Phosphorylierung des *response* Regulators CheB wird diese katalytische Domäne aktiviert (Lupas und Stock, 1989).

Die NtrC-Familie von *response* Regulatoren besteht aus Proteinen, die eine Homologie zu NtrC über die gesamte Aminosäuresequenz hinweg zeigen. Diese Regulatoren sind mit einer Länge von etwa 460 ± 20 Aminosäuren relativ groß und tragen außer der *response* Regulator-Domäne noch zwei weitere wichtige Bereiche (Übersicht in Volz, 1995). Die NtrC-ähnlichen Regulatoren arbeiten meist mit dem Transkriptionsfaktor σ^{54} zusammen und tragen eine entsprechende Erkennungssequenz für dieses Protein. Weiterhin sind diese Regulatoren durch ein *helix-turn-helix*-(HTH)-Motiv am Carboxy-Terminus zur DNA-Bindung befähigt. Das Zweikomponentensystem NtrB/NtrC ist in die Regulation von Genen involviert, die Proteine des Stickstoff-Fixierungsprozesses kodieren. In *R. capsulatus* z. B., erhält die cytoplasmatische Sensorkinase NtrB über GlnB ein Signal, das auf Grund der Ammoniumverfügbarkeit innerhalb der Zelle generiert wird. Bei niedrigem Ammoniumgehalt autophosphoryliert NtrB und überträgt die Phosphatgruppe auf den *response* Regulator NtrC. Das phosphorylierte NtrC kann seinerseits an die Promotorregion eines weiteren Transkriptionsaktivators (NifA) binden und dessen Expression aktivieren. Die Bindung von NifA an die Promotorregion des *nifHDK*-Operons führt dann zu dessen Expression und somit zur Synthese der Strukturproteine für die Nitrogenase (Übersicht in Kranz und Cullen, 1995).

Die Mitglieder der FixJ-Familie von *response* Regulatoren sind deutlich kleiner als die vorher beschriebenen Regulatoren vom NtrC-Typ. Die FixJ-ähnlichen *response* Regulatoren haben nur eine Größe von etwa 220 Aminosäuren. Zu dieser Familie gehören Proteine wie zum Beispiel FixJ, NarL und LuxR (Baikalov *et al.*, 1996). FixJ ist ein *response* Regulator, der wie auch NtrC an der Regulation von Genen beteiligt ist, die Proteine des Stickstoff-Fixierungsprozesses kodieren. Das FixL/FixJ-Zweikomponentensystem aktiviert die entsprechenden Gene, wenn in der Umgebung ein niedriger Sauerstoffpartialdruck vorliegt.

Die vierte Gruppe von *response* Regulatoren ist die OmpR-Familie. Hierzu gehören zum Beispiel OmpR, PhoB, PhoP und VirG. Die Familie wird auf Grund von Homologien zu OmpR über die gesamte Aminosäuresequenz der Proteine bestimmt.

Alle diese zu OmpR homologen Proteine bestehen aus zwei Domänen und sind etwa 230 Aminosäuren lang (Übersicht in Volz, 1995). Zu dem Zweikomponentensystem dem OmpR angehört, zählt außer dem *response* Regulator auch die membrangebundene Sensorkinase EnvZ. Dieses System reguliert die Synthese der Porinproteine OmpC und OmpF auf Grund der Osmolarität der Umgebung (Mattison, 2002). In Abbildung 1.1 sind verschiedene *response* Regulatoren gezeigt.

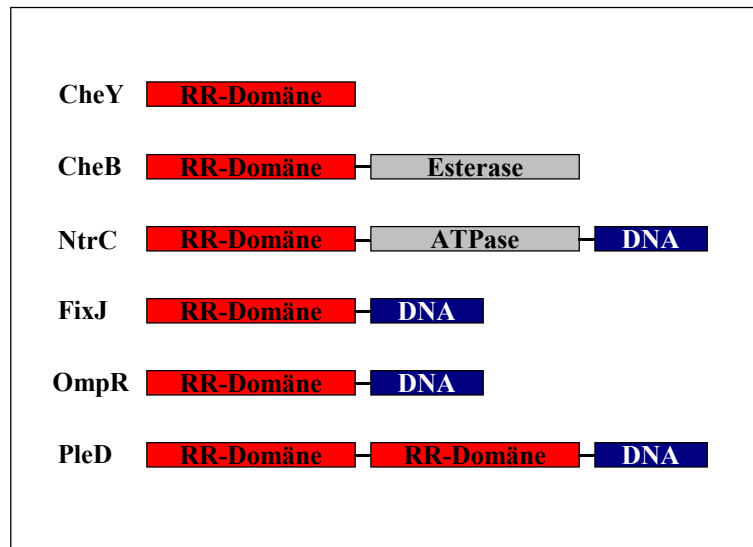


Abb. 1.1: Typische Organisation von Domänen innerhalb von *response* Regulator Proteinen: RR-Domäne: *response* Regulator Domäne; DNA: DNA-Bindedomäne; Esterase: Katalytische Domäne mit Esterase-Aktivität; ATPase: ATP-bindende Domäne mit ATPase-Aktivität. (nach Volz, 1995)

1.3 Regulation der Expression von Photosynthesegenen bei *Rhodobacter capsulatus*

1.3.1 *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus gehört zur Familie der schwefelfreien Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*) und wird der α -Gruppe der Proteobakterien zugeordnet. *Rhodobacter* ist ein etwa 0,2 μm langes, Gram-negatives Bakterium, das eine stäbchenförmige Gestalt und eine Begeißelung besitzt. Das Genom von *R. capsulatus* hat eine Größe von $3,8 \times 10^6$ bp (Fonstein und Haselkorn, 1993) und weist einen hohen GC-Gehalt von 65 % auf (Alberti *et al.*, 1995). Als natürliche Habitate dienen *Rhodobacter* die oberen lichtdurchdrungenen Schichten von stehenden oder langsam fließenden Gewässern, sowie feuchter Boden und Schlamm. Die Bakterien können

verschiedene Stoffwechselwege zur Energiebereitstellung nutzen: aerobe Respiration, anoxygene Photosynthese, anaerobe Respiration und sogar Fermentation sind möglich (Übersicht in Madigan, 1995). Die Wahl des jeweiligen Stoffwechselweges hängt unter anderem von der Verfügbarkeit des Sauerstoffs ab. Unter aeroben Bedingungen nutzt *Rhodobacter* die aerobe Respiration zur Gewinnung von ATP. Wenn der Sauerstoffpartialdruck unter einen Schwellenwert fällt wird die Bildung des Photosyntheseapparates induziert, zur Energiegewinnung dient allerdings auch dann die aerobe Respiration. Erst wenn kein Sauerstoff mehr vorhanden ist, wird, in der Gegenwart von Licht, eine anoxygene Photosynthese betrieben (Übersicht in Bauer *et al.*, 1993; Gregor und Klug, 1999). Anaerobe Respiration und Fermentation werden nur dann genutzt, wenn weder Sauerstoff noch Licht verfügbar sind. Sauerstoff ist also nicht nur für die Wahl des entsprechenden Stoffwechselweges ausschlaggebend, er reguliert auch die Bildung des Photosyntheseapparates in *R. capsulatus* (Übersicht in Bauer *et al.*, 1993; Gregor und Klug, 1999). Diese Regulation spielt sich auf verschiedenen Ebenen ab. Sauerstoff wirkt sowohl auf die Transkriptionsrate von Photosynthesegenen, als auch auf mRNA-Stabilität (Klug, 1991) und posttranslationale Schritte. Eine wichtige Rolle bei der Sauerstoff-regulierten Expression von Photosynthesegenen spielt das RegB/RegA-Zweikomponentensystem (Sganga und Bauer, 1992; Mosley *et al.*, 1994).

1.3.2 Aufbau und Funktion des Photosyntheseapparates von *Rhodobacter capsulatus*

Der Photosyntheseapparat von *R. capsulatus* ist aus drei verschiedenen Pigment-Protein-Komplexen aufgebaut: dem Reaktionszentrum (RC), dem Antennenkomplex I (LH-I) und dem Antennenkomplex II (LH-II). Das an diese drei Pigment-Protein-Komplexe gebundene Bakteriochlorophyll weist verschiedene Absorptionsmaxima auf. So absorbiert an LH-II gebundenes Bakteriochlorophyll (Bch) bei 800-850 nm, während an LH-I gebundenes Bakteriochlorophyll bei etwa 870 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Das an das Reaktionszentrum gebundene Bakteriochlorophyll absorbiert bei etwa 875 nm und bei 803 nm. Zusätzlich weisen die einzelnen Bakteriochlorophyll-Moleküle noch sogenannte charakteristische Nebenabsorptionsmaxima auf. So absorbiert sowohl proteingebundenes als auch freies Bakteriochlorophyll generell bei etwa 590 nm und bei 375 nm. Die verschiedenen Absorptionsmaxima der einzelnen proteingebundenen Bakteriochlorophyll-Moleküle dienen der Weiterleitung der Elektronen innerhalb des Photosyntheseapparates (PSA). Die eingehende Lichtenergie

wird vom LH-II aus über den LH-I bis hin zum bei längster Wellenlänge absorbierenden Bakteriochlorophyll im RC weitergeleitet. Dieser Energiefluss wird durch Elektronenresonanztransfer der Bakteriochlorophyll-Moleküle bewirkt. Vom Reaktionszentrum ausgehend werden die angeregten Elektronen auf Chinone übertragen, die dann für die Weiterleitung der Elektronen in den Cytochrom b/c₁-Komplex sorgen. Anschließend erfolgt die Übertragung der Elektronen auf ein Cytochrom, das dann wiederum für den Rücktransport der Elektronen zum Reaktionszentrum sorgt (siehe Abbildung 1.2).

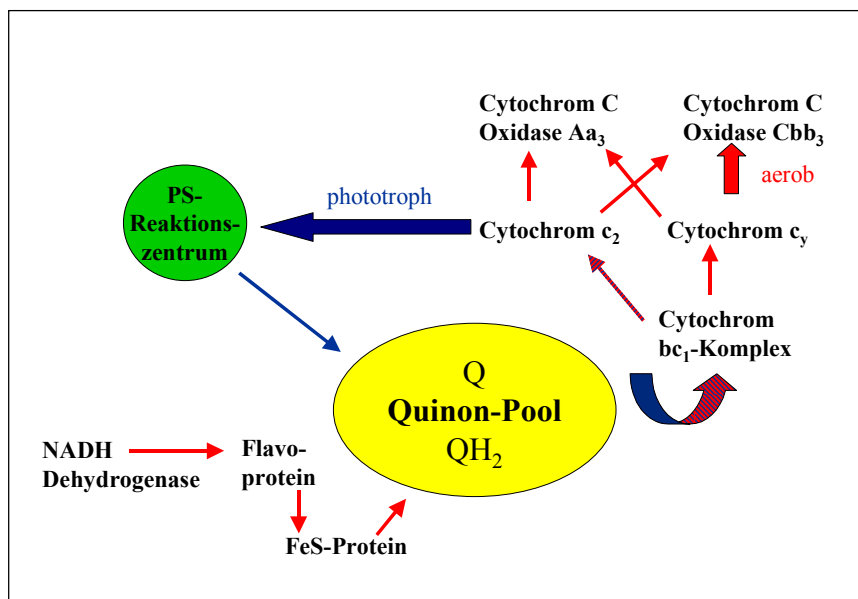


Abb. 1.2: Photosynthetischer und aerober Elektronentransport in *R. sphaeroides*: Blaue Pfeile weisen auf photosynthetischen Elektronentransport hin, rote Pfeile stehen für den Elektronentransport unter aeroben Bedingungen. Pfeile, die beide Farben tragen, repräsentieren Transportwege, die sowohl unter aeroben als auch unter photosynthetischen Bedingungen genutzt werden. *R. capsulatus* hat im Gegensatz zu *R. sphaeroides* keine Cytochrom C Oxidase Aa₃ (nach Oh und Kaplan, 2000).

Die hier beschriebene Photosynthese findet nur unter anaeroben Bedingungen statt. An dieser sehr ursprünglichen Form der Photosynthese ist ein zyklischer Elektronentransport mit nur einer einzigen Lichtreaktion beteiligt. Bei der Photosynthese der Purpurbakterien reicht das Reduktionspotenzial des primären Elektronenakzeptors Ubichinon nicht aus, um eine direkte Reduktion von NAD bzw. Ferredoxin zu bewirken. Um zu reduziertem NAD zu gelangen, müssen die Purpurbakterien einen energieabhängigen reversen Elektronentransport durchführen. Die so aus dem zyklischen Elektronentransport entfernten Elektronen müssen durch

äußere Elektronendonatoren ersetzt werden. Im Unterschied zu grünen Pflanzen können Purpurbakterien Wasser nicht als Wasserstoffdonor verwerten, sie benötigen stärker reduzierte Verbindungen. Hierzu dienen im Falle der schwefelfreien Purpurbakterien organische Substrate wie Malat und Succinat. Deshalb entwickeln diese Bakterien bei ihrer Photosynthese auch keinen Sauerstoff, sondern betreiben eine anoxygene Photosynthese (Übersicht in Schlegel, 1992).

Im Photosyntheseapparat von Purpurbakterien gehören neben dem Bakteriochlorophyll auch Carotinoide zu den wichtigen Bestandteilen. Diese akzessorischen Pigmente absorbieren Licht in einem Spektralbereich von etwa 400 - 550 nm. Die Carotinoide erfüllen zwei wichtige Funktionen innerhalb der Zelle. Einerseits gehören sie zu den photosynthetisch aktiven Antennenpigmenten, die dem Bakteriochlorophyll die Energie zuleiten, andererseits haben sie eine Schutzfunktion. Sie schützen die Bakteriochlorophyll-Moleküle vor photooxidativen Schäden (Übersicht in Schlegel, 1992).

Der PSA von *R. capsulatus* ist aus unterschiedlichen Mengen der einzelnen Pigment-Protein-Komplexe aufgebaut. LH-I ist in einer ringförmigen Struktur um das Reaktionszentrum angeordnet. Das Verhältnis von RC zu LH-I beträgt etwa 1:15. Das Verhältnis von LH-II zu LH-I-RC variiert je nach Licht- und Sauerstoffverhältnissen (Zhu und Hearst, 1986). Die einzelnen Pigment-Protein-Komplexe sind aus mehreren Protein-Untereinheiten aufgebaut (siehe Abbildung 1.3). Das LH-II-Molekül besteht aus den Proteinen α , β und γ . LH-I ist aus den Protein-Untereinheiten a und b aufgebaut. Diese beiden Proteine dienen der Membranverankerung der Pigmente und der funktionellen Ausrichtung der Moleküle. Die drei Protein-Untereinheiten H, L und M tragen zur Struktur des Reaktionszentrums bei. Das M-Protein ist mit den Pigmenten assoziiert und wird wie auch das L-Protein vom *puf*-Operon kodiert. Das *pufA*-Gen kodiert das nicht pigmentbindende H-Protein, dessen Funktion für die Synthese des PSA von großer Bedeutung ist (Zhu und Hearst, 1986; Wong *et al.*, 1996).

Die Proteine des LH-I und die des Reaktionszentrums werden vom *puf*-Operon kodiert. Dieses Operon trägt zusätzlich die Gene *pufQ* und *pufX*. Das PufQ-Protein ist ein äußerst hydrophobes Protein, das mit der Membran von *R. capsulatus* assoziiert vorliegt (Fidai *et al.*, 1994). Weiterhin wurde eine Bindung von PufQ an Protochlorophyllid, einen Vorläufer des Bakteriochlorophylls, beschrieben (Fidai *et al.*, 1994). PufQ könnte einen stimulierenden Effekt auf die Bakteriochlorophyllsynthese ausüben (Fidai *et al.*, 1995). PufX spielt eine wichtige Rolle für die Struktur des funktionellen

Photosyntheseapparates. Die Abwesenheit des PufX-Proteins führt zu einem Verlust des effizienten Elektronentransfers vom Reaktionszentrum zum Cytochrom b/c₁-Komplex (Lilburn *et al.*, 1992).

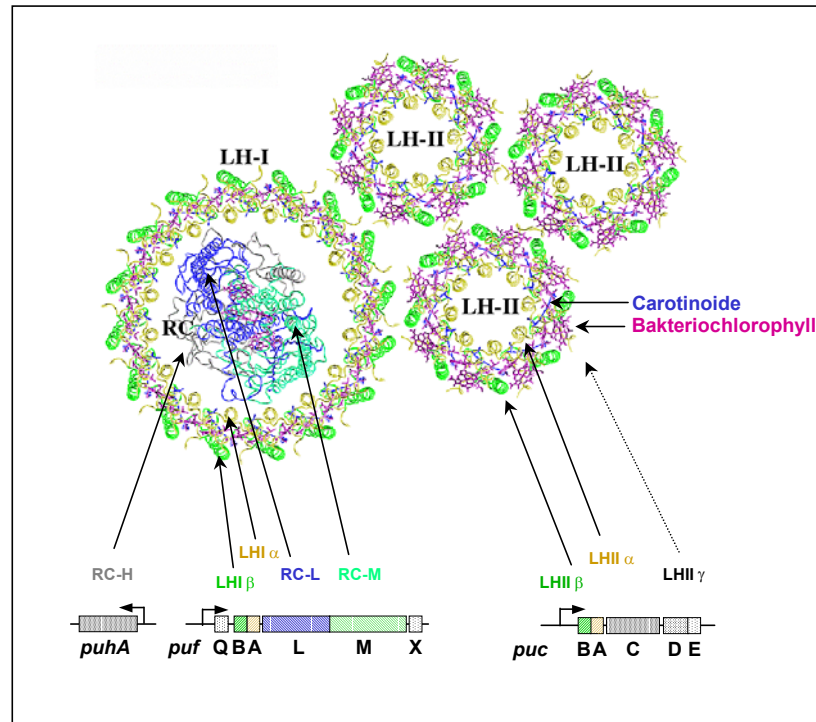


Abb. 1.3: Modell des Photosyntheseapparates (PSA) von *Rhodobacter spec.* Im oberen Bereich der Graphik ist eine Aufsicht auf das Reaktionszentrum (RC), umgeben von einem Ring aus Antennenkomplex I (LH-I) gezeigt. Dieser Komplex ist umgeben von Antennenkomplex II-Molekülen (LH-II). Im unteren Bereich der Abbildung sind die Operons gezeigt, die die Proteine des PSA kodieren. (nach Hebermehl, Doktorarbeit 1999)

Das *puc*-Operon kodiert die Proteine des LH-II. Hierzu gehören die pigmentbindenden Proteine PucA und PucB, sowie die nicht-pigmentbindenden Proteine PucD und PucE, die für eine Stabilisierung des B800-850-Komplexes (LH-II) sorgen (Tichy *et al.*, 1991). *pucC* kodiert ein regulatorisches Membranprotein, das für die Synthese des LH-II essentiell ist (Le Blanc und Beatty, 1996; Tichy *et al.*, 1991). In Abbildung 1.3 ist der Aufbau des Photosyntheseapparates von *Rhodobacter* dargestellt.

1.3.3 Das RegB/RegA-Zweikomponentensystem

Der *response* Regulator des RegB/RegA-Zweikomponentensystem von *R. capsulatus* wurde 1992 von Sganga und Bauer identifiziert (Abbildung 1.4). Kurze Zeit später konnte die zugehörige Sensorkinase RegB beschrieben werden (Mosley *et al.*, 1994).

Die Sensorkinase RegB ist ein 47 kD großes Protein, das mit sechs Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran verankert ist (Chen *et al.*, 2000). Das für die Autophosphorylierung des Proteins essentielle Histidin befindet sich an Position 204 der Aminosäuresequenz. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine Aufschlüsse darüber, wie RegB das Signal für niedrigen Sauerstoffpartialdruck wahrnimmt.

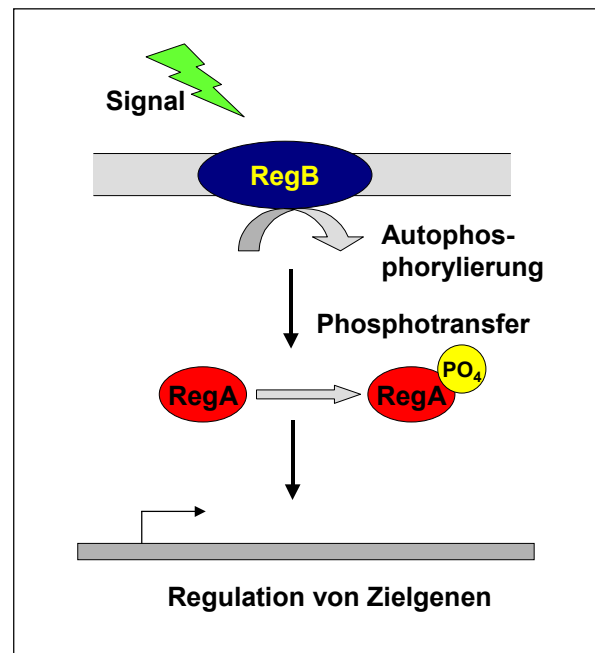


Abb. 1.4: Das RegB/RegA Zweikomponentensystem von *R. capsulatus*: Die Aufnahme eines externen Signals durch RegB auf Grund von niedrigem Sauerstoffpartialdruck führt zur Autophosphorylierung der Sensorkinase. Die Phosphorylierung wird dann auf den *response* Regulator RegA übertragen. Die Bindung von phosphoryliertem RegA an die Promotorregion von Zielgenen führt zur spezifischen Regulation der Genexpression.

Die Sensorkinase FixL aus *Rhizobium meliloti*, die ebenfalls durch ein Sauerstoff-Signal angeregt wird, trägt eine zur Sauerstoffbindung befähigte Häm-Untereinheit (Gilles-Gonzales *et al.*, 1991). Eine solche Untereinheit konnte für RegB nicht identifiziert werden. Deshalb ist anzunehmen, dass RegB die Sauerstoffverfügbarkeit über den Redoxzustand anderer Proteine wahrnimmt. Ein solches Modell konnte anhand experimenteller Daten für das nahe verwandte Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* aufgestellt werden.

Das RegB/RegA homologe Zweikomponentensystem in *R. sphaeroides* trägt den Namen PrrB/PrrA-Zweikomponentensystem (Abbildung 1.5). PrrB ist die membran-gebundene Sensorkinase, die wie RegB auf niedrigen Sauerstoffpartialdruck mit Autophosphorylierung reagiert. Das Signal für PrrB wird direkt durch die Atmungskette

generiert. Die Q-Untereinheit der Cytochromoxidase Cbb₃ ist für die Funktion der terminalen Oxidase nicht von Bedeutung (Oh und Kaplan, 2000). Diese Untereinheit nimmt lediglich den Elektronenfluss durch die Oxidase wahr. Solange ein stetiger Elektronenfluss besteht, sendet die Q-Untereinheit ein negatives Signal über das Membranprotein PrrC an die Sensorkinase PrrB.

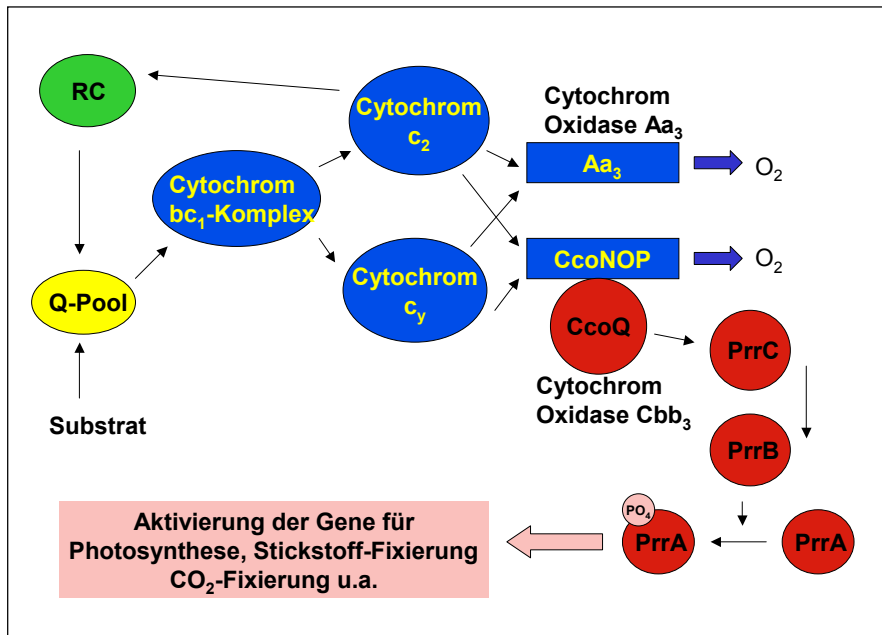


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Elektronentransports und des inhibitorischen Signals für die Sensorkinase PrrB in *R. sphaeroides*. Unter aeroben Bedingungen werden die Elektronen vom Chinonpool (Q-Pool) aus über den Cytochrom bc₁-Komplex und die Cytochrome c₂ und c_y zu den terminalen Oxidasen Cytochrom Oxidase Aa₃ und Cbb₃ geleitet. Durch den Elektronenfluss durch die Oxidase Cbb₃ kommt es über das Protein PrrC zu einem inhibitorischen Signal für die Sensorkinase PrrB des PrrB/PrrA-Zweikomponentensystems. Versiegt der Elektronenfluss, so wird auch das inhibitorische Signal aufgehoben, und PrrB phosphoryliert den *response* Regulator PrrA. Durch Bindung des phosphorylierten PrrA an die DNA kommt es zur Aktivierung verschiedener Zielgene (nach Oh und Kaplan, 2000).

Fällt der Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung ab, so versiegt auch der Elektronenfluss durch die terminale Oxidase Cbb₃. In diesem Fall wird das negative Signal der Q-Untereinheit unterbunden. Dies führt wiederum zu einer Autophosphorylierung von PrrB und einer anschließenden Signalweiterleitung an den *response* Regulator PrrA (Oh und Kaplan, 2000). Das phosphorylierte PrrA Protein aktiviert dann die Expression von Photosynthesegenen in *R. sphaeroides* (Eraso und Kaplan, 1994)). Wie bereits oben erwähnt, wurde dieses System der Signalwahrnehmung lediglich für *R. sphaeroides* gezeigt. Auf Grund der ähnlich aufgebauten Signalkette in *R. capsulatus* und der sehr homologen Struktur der beiden

Sensorkinasen (Chen *et al.*, 2000; Ouchane und Kaplan, 1999), liegt die Vermutung nahe, dass die Generierung des Signals bei *R. capsulatus* in ähnlicher Weise erfolgen könnte. Interessanterweise besitzt *R. capsulatus* im Gegensatz zu *R. sphaeroides* nur eine terminale Oxidase, die Cytochrom Oxidase Cbb₃. Diese spielt auch in *R. sphaeroides* eine wichtige Rolle, da nur ein geringer Teil der Elektronen durch die terminale Cytochrom Oxidase Aa₃ geleitet wird. (Oh und Kaplan, 2000).

Die Sensorkinase RegB ist nach der Autophosphorylierung in der Lage, die Phosphatgruppe auf den *response* Regulator RegA zu übertragen. RegA ist ein 21 kDa großes Protein. Es zeigt starke Homologie zu Proteinen der drei *response* Regulator-Familien und konnte anhand der Struktur der FixJ-Familie zugeordnet werden. Das Protein besteht aus zwei Domänen, der N-terminalen Phosphorylierungsdomäne und der C-terminalen DNA-bindenden Domäne. Innerhalb der Phosphorylierungsdomäne befindet sich an Aminosäureposition 63 ein hochkonservierter Aspartatrest, der als Phosphorylierungsstelle des Proteins genutzt wird. Ein Austausch von Aspartat zu Lysin führt zu einer Inaktivierung des Proteins (Hemschemeier *et al.*, 2000). Nach der Phosphorylierung des Aspartat 63 ist RegA in der Lage die Expression verschiedener Zielgene zu aktivieren bzw. zu reprimieren (Elsen *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu vielen anderen *response* Regulatoren führt die Phosphorylierung von RegA nicht zu einer verstärkten Bindung an die Ziel-DNA (Hemschemeier *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung des *response* Regulators bewirkt meist eine Konformationsänderung des Proteins, die es dem Regulator ermöglicht, an seine Zielsequenz zu binden. RegA ist auch in unphosphoryliertem Zustand in der Lage, an DNA zu binden. Die Affinität von RegA zu seiner Ziel-DNA wird durch die Phosphorylierung des Proteins kaum beeinflusst (Hemschemeier *et al.*, 2000). Allerdings führt die DNA-Bindung des unphosphorylierten RegA Proteins nicht zu einer Aktivierung der Expression der Zielgene. Die Phosphorylierung von RegA scheint also für die DNA-Bindung nicht nötig zu sein, wohl aber für die regulatorische Funktion des Proteins. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von RegA zu einer Interaktion mit weiteren Proteinen führt. Diese Interaktion bewirkt dann die spezifische Regulation von Zielgenen. 1998 wurde von Du *et al.* die konstitutiv aktive RegA-Variante RegA* isoliert. Dieses Protein trägt einen Aminosäureaustausch von Alanin nach Serin an Position 95 der Aminosäuresequenz innerhalb der Verbindungsregion zwischen Phosphorylierungs- und DNA-Bindedomäne des RegA-Proteins. Durch diese Mutation wird das Protein ständig in einer Konformation gehalten, die der phosphorylierten Form

des Proteins ähnelt. Die Expression von RegA* in *R. capsulatus* RegA- bzw. RegB-Deletionsmutanten bewirkte eine Komplementation des entsprechenden Phänotyps. Die Zellen waren daher in der Lage, die gleichen Mengen an Photosynthese-Komplexen zu produzieren wie der Wildtyp.

Die Phosphorylierung von RegA ist ein reversibler Prozess. Die Dephosphorylierung des Proteins wird ebenfalls von der Sensorkinase RegB ausgeführt. Neueren Untersuchungen in *R. sphaeroides* zufolge ist der Grundstatus von RegB bzw. PrrB die Kinasefunktion (Oh *et al.*; 2001). Demnach führt ein Ausschalten des inhibitorischen Signals aus der Atmungskette zur Autophosphorylierung des Proteins. Durch das Signal von PrrC wird die Funktion von PrrB (RegB) zum Phosphatase-Modus hingeleitet. Deshalb kommt es zu einer Dephosphorylierung von PrrA (RegA) und die Photosynthesegene werden somit nicht exprimiert (Abbildung 1.5). Wie bereits oben erwähnt ist das RegB/RegA Zweikomponentensystem an der Regulation der Photosynthesegene in *R. capsulatus* beteiligt. Darüber hinaus reguliert das System aber auch die Expression zahlreicher anderer Gene (Abbildung 1.6).

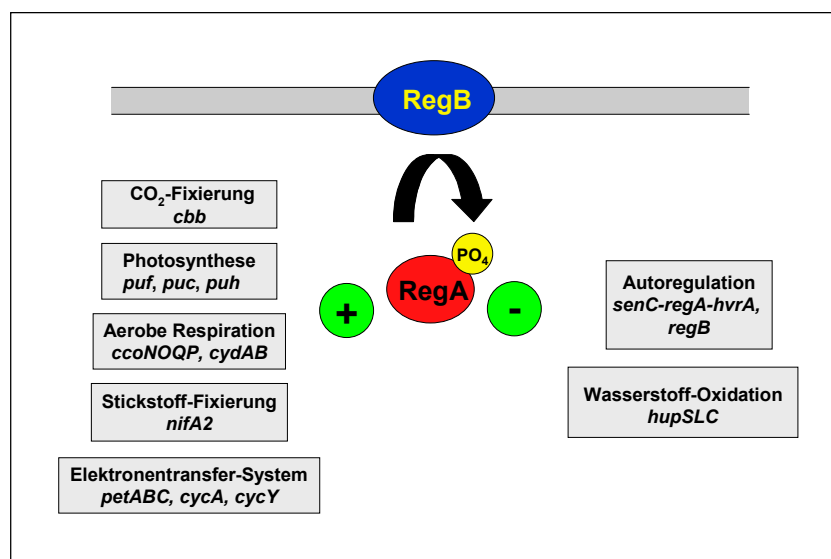


Abb. 1.6: Von dem Zweikomponentensystem RegB/RegA regulierte Prozesse. Durch Autophosphorylierung der Sensorkinase RegB kommt es zum Transfer des Phosphats auf den response Regulator RegA. Das phosphorylierte RegA aktiviert die Expression von Genen, die in CO₂-Fixierung, Photosynthese, aerobe Respiration, Stickstoff-Fixierung und die Synthese des Elektronentransfer-Systems involviert sind. Gleichzeitig findet eine negative Regulation der Gene für Wasserstoff-Oxidation und der eigenen Expression von RegA statt (nach Swem *et al.*, 2001)

Auf die Gene für Stickstoff- und Kohlendioxidfixierung (Dubbs *et al.*, 2000), sowie auf Gene, die Proteine der Atmungskette oder des Elektronentransports kodieren, hat das RegB/RegA Zweikomponentensystem einen aktivierenden Einfluss (Swem *et al.*, 2001). Negativ reguliert werden die Gene für Wasserstoff-Oxidation. Auch eine negative autoregulatorische Funktion des Systems konnte festgestellt werden (Elsen *et al.*, 2000).

Die Beteiligung des RegB/RegA-Zweikomponentensystems an vielfältigen regulatorischen Prozessen innerhalb der Zelle legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein sehr globales Regulationssystem handelt. Da die meisten Stoffwechselwege nicht nur sauerstoffabhängig aktiviert werden, sind zahlreiche weitere Proteine erforderlich, um die Feinregulierung der jeweiligen Gene zu koordinieren.

1.3.4 Photosynthese-Gencluster in *R. capsulatus*

Fast alle Gene, die für die Bildung des Photosyntheseapparates von *Rhodobacter* notwendig sind, befinden sich in einem 46 kb großen Photosynthese-Gencluster des Chromosoms (Bauer *et al.*, 1991). Flankiert werden diese Gene an einem Ende vom *puhA*-Gen, das die nicht-pigmentbindende Untereinheit des Reaktionszentrums codiert, und am anderen Ende vom *puf*-Operon (siehe Abbildung 1.7). Das polycistronische *puf*-Operon enthält die Gene für die Strukturproteine des Antennen-Pigment- bzw. *lightharvesting*-(LH)-Komplex I LH-I- α und LH-I- β und des Reaktionszentrums (RC). Zentral im Photosynthese-Gencluster liegen die Gene für Bakteriochlorophyll (Bch) und Carotinoidsynthese (Crt). Die Organisation der Gene als sogenanntes Superoperon hat eine gekoppelte Expression der Gene für Pigmente und Proteine des Photosyntheseapparates zur Folge (Young *et al.*, 1989). So werden zum Beispiel die Gene des *puf*-Operons nicht nur vom *puf*-Promotor aus transkribiert, sondern auch vom stromaufwärts gelegenen *bchC*-Promotor und dem *crtE*-Promotor (Wellington *et al.*, 1991).

Die vom *puf*-Operon kodierten Proteine werden zur Bildung des Photosyntheseapparates in bestimmtem stöchiometrischem Verhältnis benötigt. Wie bereits oben erwähnt, sollte ein RC-Molekül von 10-15 LH-I-Molekülen umgeben sein. Diese unterschiedlichen Mengen werden durch verschiedene Stabilitäten einzelner mRNA-Segmente des *puf*-Operons gewährleistet (Übersicht in Klug, 1993).

An ganz anderer Stelle im *Rhodobacter* Chromosom liegt das ebenfalls polycistronische *puc*-Operon. Es kodiert die pigmentbindenden Untereinheiten des LH-II, LH-II- α und

LH-II- β , sowie die nicht-pigmentbindende Untereinheit LH-II- γ . Wie das *puf*-Operon ist auch das *puc*-Operon posttranskriptionellen Regulationsmechanismen unterworfen. Die Promotoren des *puf*- und des *puc*-Operons weisen nur eine geringfügige Ähnlichkeit auf. Der *puc*-Promotor ähnelt in seiner Struktur einem σ^{70} -abhängigen Promotor (Nickens und Bauer, 1998), was auch für die Promotoren der Bakteriochlorophyll- und Carotinoid- synthese gene zutrifft.

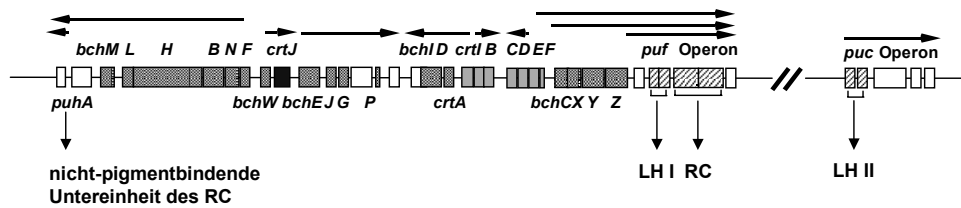


Abb. 1.7: Photosynthese-Gencluster: Das Photosynthese-Gencluster von *R. capsulatus* enthält annähernd alle zur Bildung des PSA wichtigen Gene. Lediglich die Gene für die Strukturproteine des LH-II werden außerhalb des Clusters im *puc*-Operon kodiert. Die Pfeile über den jeweiligen Genen deuten die Länge der jeweiligen Primärtranskripte an. Die Gene des *puf*-Operons werden demnach von drei verschiedenen Promotoren aus transkribiert. *bch*: Bakteriochlorophyll; *crt*: Carotinoid

Der etwa 700 bp *upstream* des *pufB*-Gens gelegene *puf*-Promotor ist in seiner Struktur weder σ^{54} - noch σ^{70} -abhängigen Promotoren ähnlich, wird aber von der *housekeeping* RNA-Polymerase in *R. capsulatus* erkannt (Nickens und Bauer, 1998). Für die sauerstoffregulierte Expression des *puf*-Operons ist eine spiegelsymmetrische Sequenz in der Region -30 bis -57 relativ zum Transkriptionsstart essentiell (Klug, 1991). Diese sogenannte „*Dyad Symmetry*“ wurde als Bindungsstelle für das Repressorprotein *puf*-Promotor-Bindeprotein (PPBP) identifiziert (Taremi und Marrs, 1990; Klug, 1991). Auch für den *response* Regulator RegA wurden in dieser Region Sequenzen beschrieben, die für die Bindung des Proteins von Bedeutung sind (Hemschemeier *et al.*, 2000).

1.3.5 Transkriptionelle Regulation von Photosynthesegenen bei *Rhodobacter*

Während in *R. capsulatus* auch unter aeroben Bedingungen eine geringfügige Grundexpression der Photosynthese-(PS)-Gene zu beobachten ist, findet bei

R. sphaeroides annähernd keine Synthese von PS-Komplexen statt. Trotz der nahen Verwandtschaft der beiden Bakterienarten verfolgen beide eine unterschiedliche Strategie. *R. sphaeroides* benötigt etwas mehr Zeit, um sich an einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck (pO_2) anzupassen. *R. capsulatus* dagegen ist bei niedrigem pO_2 schneller in der Lage, seinen Photosyntheseapparat zu synthetisieren, muss aber unter aeroben Bedingungen in erhöhtem Maße für Schutzmechanismen gegen photooxidativen Stress sorgen (Übersicht in Gregor und Klug, 1999). Größtenteils verläuft die Regulation der PS-Gene in den beiden *Rhodobacter* Spezies sehr ähnlich, es gibt jedoch einige Regulationsmechanismen, die nur für eine der beiden Arten beschrieben sind. Deshalb soll im Folgenden auf die Regulation der PS-Gene in beiden Organismen, *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*, getrennt eingegangen werden. Eine Zusammenfassung der wichtigsten regulatorischen Faktoren der PS-Genexpression aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*, ist in Abbildung 1.8 gezeigt.

1.3.5.1 *Rhodobacter capsulatus*

Wie bereits oben genauer erläutert wurde, werden die für den Aufbau des Photosyntheseapparates notwendigen Proteine vom Photosynthese-*Gencluster* bzw. dem extern gelegenen *puc*-Operon kodiert. Die koordinierte Expression der einzelnen Gene wird auf vielfältige Art und Weise gewährleistet. So hat zum Beispiel das oben beschriebene Zweikomponentensystem RegB/RegA bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck eine aktivierende Wirkung auf die Expression des *puf*- und des *puc*-Operons. In der Promotorregion des *puf*-Operons wurden drei Bindungsstellen für den *response* Regulator RegA identifiziert, im Bereich des *puc*-Promotors befinden sich vier Bindungsstellen für RegA (Hemschemeier *et al.*, 2000). Diese Sequenzen, an denen eine Interaktion von RegA und DNA stattfindet, überlappen mit der Bindungsstelle für ein weiteres Regulatorprotein, dem *Integration Host Factor* (IHF) (Kirndörfer *et al.*, 1998). Auch für andere bakterielle Promotoren wurde bereits ein Regulationsmechanismus beschrieben, der eine Bindung von IHF an DNA-Sequenzen beinhaltet, die ebenfalls durch andere Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Die Bindung von IHF führt zur Krümmung der DNA (Dhavan *et al.*, 2002). Auf diesem Wege können Regulatorproteine, die an die Promotorregion gebunden sind, räumlich angenähert werden und die Interaktion der Proteine untereinander oder mit anderen Faktoren wird erleichtert (Wassem *et al.*, 2000). Im Falle des IHF von *R. capsulatus* führt eine Deletion des entsprechenden Gens *himA* zu einer verlangsamten Expression von *puf*- und *puc*-Operon (Kirndörfer *et al.*, 1998). Die Expression der

Bakteriochlorophyllgene vom *bchD*-Promotor aus sind in einer *himA*-Mutante nicht verändert (Kirndörfer *et al.*, 1998). IHF scheint also eine stimulierende Wirkung auf die Expression von *puf*- und *puc*-Operon zu haben. Die Gene dieser beiden Operons werden somit bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck RegA- und IHF-abhängig aktiviert.

Zusätzlich zu dieser positiven Regulation der PS-Operons wurde aber auch eine reprimierende Wirkung weiterer Proteine auf die Expression von *puf*- und *puc*-Operon beschrieben. Hierzu zählt das oben bereits erwähnte *puf*-Promotor-Bindeprotein (PPBP) (Taremi und Marrs, 1990). Dieses Protein bindet wie auch RegA an die *puf*-Promotorregion. Die für PPBP identifizierte Bindungsstelle liegt innerhalb der sogenannten *dyad symmetry*, einer spiegelsymmetrischen Region innerhalb der *puf*-Promotorsequenz (Klug, 1991). Die Interaktion von PPBP und DNA findet im Gegensatz zur RegA-Bindung nur unter hohem Sauerstoffpartialdruck statt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass PPBP in phosphoryliertem Zustand zur DNA-Bindung befähigt ist. Eine Dephosphorylierung von PPBP führt zu einer geringeren Zahl von DNA-Protein-Komplexen (Klug, 1991). Es scheint also, dass PPBP bei hohem Sauerstoffpartialdruck phosphoryliert vorliegt und in diesem Zustand die *puf*-Promotorregion im Bereich der *dyad symmetry* binden kann. Durch Absinken des pO_2 kommt es zur Dephosphorylierung des Proteins und die Affinität zur DNA wird geringer. Da sich die Bindungsstellen von RegA und PPBP überschneiden, scheint es zu einer Kompetition der beiden Proteine um freie Bindungsstellen zu kommen. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck ist die Affinität von PPBP höher und es verdrängt RegA von der Promotorregion. Fällt der pO_2 ab, so wird RegA phosphoryliert, PPBP wird dephosphoryliert, verlässt die DNA und RegA kann die Bindungsstelle besetzen. PPBP reprimiert also die Expression des *puf*-Operons bei hohem Sauerstoffpartialdruck. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte PPBP nicht aufgereinigt werden. Auch wurde das entsprechende Gen in *R. capsulatus* nicht identifiziert.

Ein weiteres Protein, das zur Repression der PS-Gene unter aeroben Bedingungen beiträgt, ist das Carotinoid J (CrtJ). Dieses Protein erhielt seinen Namen durch die Lage des korrespondierenden Gens inmitten der Carotinoid (*crt*)- und Bakteriochlorophyll (*bch*)-Gene. CrtJ hat keine Funktion innerhalb der Carotinoidsynthese, sondern ist vielmehr ein Transkriptionsregulator. CrtJ ist zur DNA-Bindung befähigt. DNA-Bindungsstellen wurden im Bereich der *puc*- und *bchC*-Promotorregion identifiziert (Ponnampalam und Bauer, 1997). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die DNA-Bindung von CrtJ vom Redoxzustand der Umgebung beeinflusst wird. So ist die

Affinität von CrtJ zur DNA unter oxidativen Bedingungen etwa um Faktor 4,5 höher als unter reduzierenden Bedingungen. CrtJ zeigt also unter aeroben Bedingungen eine höhere Bereitschaft zur DNA-Bindung und trägt somit zur Repression von PS-Genen bei hohem Sauerstoffpartialdruck bei (Ponnampalam und Bauer, 1997).

Die Expression von Photosynthesegenen in *R. capsulatus* ist wie bereits erwähnt abhängig von zwei wichtigen Faktoren: Lichtintensität und Sauerstoffpartialdruck. Die Transkription der Gene wird sowohl durch hohen Sauerstoffpartialdruck als auch durch hohe Lichtintensität gehemmt. Ein weiterer Kontrollfaktor für die Expression von *puf*- und *puc*-Operon liegt im Bereich der Pigmentsynthese. Wenn unter induzierenden Bedingungen (niedriger pO_2) keine Pigmentsynthese stattfindet, dann wird auch die Transkription des *puf*- und des *puc*-Operons stark herabgesetzt (Rödig *et al.*, 1999). Dieser interne Rückkopplungsmechanismus verhindert die Synthese von pigmentbindenden Proteinen in der Abwesenheit von Bakteriochlorophyll. Der Mechanismus dieser Koregulation von Pigment- und Proteinsynthese konnte allerdings bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden.

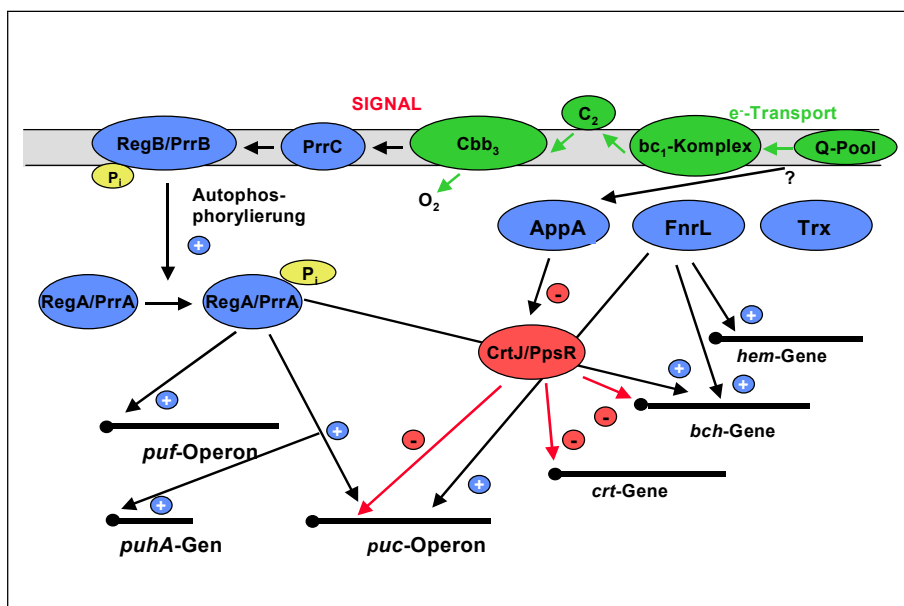


Abb. 1.8: Schema der Regulation von Photosynthesegenen in *Rhodobacter spec.*: Grün dargestellt sind die Komponenten der Atmungskette, die grünen Pfeile stehen für den Transport von Elektronen. Die blau gezeichneten Proteine sind Aktivatoren der PS-Gene, das rot dargestellte Protein fungiert als Repressor (nach Gregor und Klug, 1999).

1.3.5.2 *Rhodobacter sphaeroides*

Wie bereits oben genauer erläutert, wurde der Signalmechanismus für die Sensorkinase PrrB (RegB in *R. capsulatus*) in *R. sphaeroides* aufgeklärt. Ein weiteres Molekül, das an

der Wahrnehmung des niedrigen Sauerstoffpartialdrucks beteiligt sein könnte, ist das Thioredoxin. Thioredoxin ist ein ubiquitäres cytoplasmatisches Protein, das durch die Reduktion einer intramolekularen Disulfidbrücke den Redoxzustand der Zelle widerspiegelt. Dieses Protein ist an der Regulation der Pigmentsynthese in *R. sphaeroides* beteiligt. Thioredoxin reguliert die Aktivität der δ -Aminolevulinsäure-(ALA)-Synthase über einen Disulfid-Thiol-Austausch *in vitro* (Pasternak *et al.*, 1999). Die ALA-Synthase ist das erste Enzym der Tetrapyrrol-Synthese. Es wäre also möglich, dass Thioredoxin über die Interaktion mit der ALA-Synthase *in vivo* an der Regulation der Bakteriochlorophyll-Synthese beteiligt ist. Weiterhin wurde ein Einfluss von Thioredoxin auf die Expression der PS-Operons *puf* und *puc* beschrieben (Pasternak *et al.*, 1999). Diese Regulation könnte durch die Interaktion von Thioredoxin mit der Gyrase in *R. capsulatus* bewirkt werden (Li *et al.*, unveröffentlicht). Es wäre auch denkbar, dass Thioredoxin für die Reduktion von Transkriptionsfaktoren sorgt, die dann ihrerseits an die DNA binden und die Transkription regulieren.

Ein Protein, das redoxabhängig an DNA binden kann, ist der PS-Genrepressor CrtJ von *R. capsulatus*. Für das homologe Protein PpsR aus *R. sphaeroides* konnte dies allerdings noch nicht bestätigt werden. PpsR ist ein Protein, das unter aeroben Bedingungen die Transkription der PS-Gene reprimiert. Das Protein enthält eine carboxyterminale DNA-Bindedomäne und zwei zentral gelegene sogenannte PAS-Domänen (Gomelsky *et al.*, 2000). PAS-Domänen finden sich in vielen verschiedenen Proteinen, sie sind gewöhnlich an Signalwahrnehmung und -transduktion oder Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Repik *et al.*, 2000). Auch Änderungen in der Sauerstoff-Verfügbarkeit bzw. geänderte Redoxpotenziale können über PAS-Domänen innerhalb von Proteinen wahrgenommen werden (Taylor *et al.*, 1999). Der N-terminale Teil von PpsR konnte bis heute noch nicht genauer charakterisiert werden. PpsR ist also in der Lage, an DNA zu binden und unter aeroben Bedingungen die Transkription von PS-Genen zu reprimieren. Interessanterweise reprimiert PpsR aber auch lichtabhängig die Expression dieser Gene unter anaeroben Bedingungen. 1997 wurde von Gomelsky und Kaplan ein Protein identifiziert, das direkten Einfluss auf die Aktivität von PpsR nimmt, das AppA-Protein. Dieses Protein trägt eine FAD-Bindedomäne und könnte hierüber direkte Information über das Redoxpotenzial der Zelle weiterleiten (Gomelsky und Kaplan, 1998). Erste Ergebnisse von Braatsch und Klug (unveröffentlicht) konnten diesen Mechanismus allerdings nicht bestätigen.

Das AppA-PpsR-System wird durch den übergeordneten Modulator TspO beeinflusst (Zeng und Kaplan, 2001). TspO ist ein Membranprotein, das Ähnlichkeit mit einem eukaryotischen Benzodiazepin-Transporter hat. Durch seine Eigenschaften als Transporterprotein könnte TspO über die Anreicherung bestimmter Tetrapyrrol-Intermediate für eine Repression der PS-Gene sorgen (Yeliseev und Kaplan, 1999).

Ein weiteres Protein, das den Redoxzustand der Zelle wahrnehmen kann ist das FnrL (Fnr in *E. coli*). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Fnr über ein Eisen-Schwefel-Zentrum (FeS) redoxabhängige Regulationen durchführen kann. Das Protein ist in der Lage, im Bereich sogenannter FNR-Boxen an DNA zu binden. In *R. sphaeroides* wurden mehrere Gene der Bakteriochlorophyllsynthese (*hemA*, *hemZ*, *hemN* und *bchE*) als FnrL-abhängig regulierte Gene identifiziert (Zeilstra-Ryalls und Kaplan, 1995). Neben der unter aeroben Bedingungen reprimierenden Wirkung der CcoNOQP Cytochrom-Oxidase auf das PrrB/PrrA-Zweikomponentensystem besitzt auch RdxB eine ähnliche Funktion. RdxB ist ein membrangebundenes Protein, das zwei FeS-Zentren besitzt (Roh und Kaplan, 2000). Fehlt den Zellen RdxB oder CcoP, so produzieren sie PS-Komplexe unter aeroben Bedingungen (O’Gara und Kaplan, 1997). Auch für RdxB liegen noch keine Daten über die genaue Wirkungsweise des Proteins vor.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

R. capsulatus ist ein fakultativ phototrophes Purpurbakterium. Es ist in der Lage, eine Vielzahl von Stoffwechselwegen zu nutzen, um Energie für die Zelle bereitzustellen. Unter aeroben Bedingungen führt *Rhodobacter* eine aerobe Atmung durch. Steht kein Sauerstoff zur Verfügung kann *R. capsulatus* in Gegenwart von Licht eine anoxygene Photosynthese durchführen. Die Synthese der Photosynthese-Komplexe wird durch die Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks induziert. Der Photosyntheseapparat (PSA) wird also bereits unter Bedingungen hergestellt, die es den Bakterien noch erlauben, eine aerobe Atmung durchzuführen. Erst wenn kein Sauerstoff mehr vorhanden ist, können die Bakterien unter dem Einfluss von Licht zur Photosynthese übergehen. An der Regulation der Synthese des PSA ist neben weiteren Faktoren das RegB/RegA Zweikomponentensystem beteiligt. Fällt der Sauerstoffpartialdruck unter einen bestimmten Wert, so kommt es zur Autophosphorylierung von RegB. Die Phosphatgruppe von RegB wird anschließend auf den *response* Regulator RegA übertragen und RegA reguliert dann die Expression von Zielgenen. Zu diesen Zielgenen zählen neben den Photosynthese-Genen auch Gene für Proteine der Stickstoff-Fixierung, Kohlendioxid-Fixierung, Wasserstoff-Oxidation und andere. Diese Gene werden nicht nur auf Grund von niedrigem Sauerstoffpartialdruck exprimiert. In den meisten Fällen sind weitere Regulatoren für die Expression notwendig. Es ist anzunehmen, dass RegA mit einigen dieser Regulatorproteine in Kontakt treten muss, um eine geregelte Expression der verschiedenen Gene zu gewährleisten.

Weiterhin ist RegA im Gegensatz zu den meisten *response* Regulatoren in der Lage, bereits in unphosphoryliertem Zustand an die Promotorregion der PS-Gene zu binden. Allerdings geschieht unter diesen Bedingungen keine Expression der entsprechenden Gene. Hierfür ist die Phosphorylierung von RegA von Nöten. Diese Phosphorylierung kann eine Konformationsänderung des *response* Regulators zur Folge haben, die dann für die Interaktion von RegA mit anderen Proteinen sorgen könnte. Um solche Interaktionspartner von RegA zu identifizieren, sollte in dieser Arbeit das Hefe 2-Hybridsystem eingesetzt werden. Die so gefundenen Proteine, die eine spezifische Interaktion mit RegA zeigen, sollten anschließend genauer analysiert werden.

Neben Proteinen, die eine direkte Wechselwirkung mit RegA zeigen, existieren auch solche, die zwar mit RegA an der Regulation der entsprechenden Zielgene beteiligt sind, aber nicht in unmittelbarem Kontakt mit dem *response* Regulator treten. Zur Identifizierung solcher Proteine sollte ein System entwickelt werden, mit dem es

möglich ist, die transkriptionelle Regulation verschiedener *R. capsulatus* Promotoren zu untersuchen. Da in einer *Rhodobacter*-Zelle zu viele Faktoren Einfluss auf die Regulation der entsprechenden Promotoren nehmen können, sollte als Modellorganismus das nicht photosynthetisch aktive Bakterium *E. coli* verwendet werden.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

| Produkt | Hersteller |
|--|---------------------|
| Acrylamid | Serva |
| Agarose | FMC, Rockland USA |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) | Aldrich |
| 3-AT | Sigma |
| Bacto Agar | Difco |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | New England Biolabs |
| 5-Brom-4-Chlor-inolyphosphat (p-Toluidinsalz) (BCIP) | Boehringer |
| CDPStar | Boehringer |
| Formaldehyd | Sigma |
| Glutathion (reduziert) | Sigma |
| Hefeextrakt | Gibco |
| Imidazol | Sigma |
| Iodacetamid | Fluka |
| L-Adenin Hemisulfat | Sigma |
| L-Lysin HCl | Aldrich |
| Liciumacetat | Sigma |
| <i>Low-melting</i> Agarose | Biozym |
| Lubrol | ICN Biomedicals |
| Magnesiumsulfat | Merck |
| Maleinsäure | Sigma |
| Manganchlorid | Sigma |
| Mineralöl | Sigma |
| Mineralöl, <i>Plus One, Dry Strip Cover Fluid</i> | Pharmacia Biotech |
| N,N'-Methylen-Bisacrylamid (reinst., 2x krist.) | Serva |
| Natriumcarbonat | Merck |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck |
| Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O | Merck |
| Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid (NBT) | Boehringer |

| | |
|--|----------------------|
| Nonidet P40 (NP-40) | Fluka |
| Ortho-nitro-phenol- β -galactosid (ONPG) | Serva |
| Pepton | Gibco |
| Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF) | Sigma |
| Polyethylenglycol (PEG) | Sigma |
| Resin AG 501-X8 | Biorad |
| Rubidiumchlorid | Merck |
| Standard I Nährbouillon (St. I) | Merck |
| Synthetisches <i>Dropout</i> Medium ohne Aminosäuren | Remel |
| Tricine | ICN Biomedicals, Inc |
| Xylencyanol | Sigma |

2.2 Enzyme

| | |
|--------------------------------|---------------------|
| Lysozym | Sigma |
| Proteinase K | Roth |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs |
| Shrimps Alkalische Phosphatase | Amersham Pharmacia |
| T4 DNA-Ligase | Boehringer |
| T4 DNA-Polymerase | New England Biolabs |
| T4 Polynukleotidkinase | New England Biolabs |
| Taq-DNA-Polymerase | Qiagen |
| Vent-DNA-Polymerase | New England Biolabs |

2.3 Molekularbiologische Reagenziensätze

| | |
|---|------------|
| DIG-Markierungs-Kit | Boehringer |
| <i>in vitro</i> Transkriptions/Translations Kit | Boehringer |
| MATCHMAKER 2-Hybridssystem 3 | Clontech |
| QIAGEN Plasmidisolierungs-Kit | Qiagen |
| QIAEX II Gelextraktions-Kit | Qiagen |
| QIAquick Gelextraktions-Kit | Qiagen |
| QIAquick PCR-Aufreinigungs-Kit | Qiagen |

2.4 Material für die Säulenchromatographie

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| Glutathion-Sepharose 4B | Amersham Pharmacia |
| Nickel-NTA-Agarose | Qiagen |
| Protein A-Sepharose (CL-4B) | Pharmacia Biotech |

2.5 Radioaktiv markierte Stoffe

³²P-ATP

Amersham Pharmacia

³⁵S-Methionin

Amersham Pharmacia

2.6 Antikörper

Anti-DIG Konjugat mit Alkalischer Phosphatase

Sigma

Anti-Rabbit Konjugat mit Alkalischer Phosphatase

Sigma

2.7 Größenstandards

1 kb ladder

Gibco BRL

Broadrange Proteinmarker

New England Biolabs

Rainbow-Proteinmarker, low range

Amersham Pharmacia

Silverstain-Proteinmarker, low range

Bio Rad

2.8 Antibiotika

| Bezeichnung | Lösungsmittel | Konzentration f. <i>E. coli</i> (µg/µl) | Konzentration f. <i>R. capsulatus</i> (µg/µl) |
|---------------|--------------------|--|--|
| Ampicillin | ddH ₂ O | 100-200 | - |
| Genatmycin | ddH ₂ O | 10 | 10 |
| Kanamycin | ddH ₂ O | 25 | 25 |
| Spectinomycin | ddH ₂ O | 10 | 10 |
| Tetracyclin | 70 %-iges Ethanol | 25 | 1-2 |

2.9 Stämme

2.9.1 *E. coli*

BL21 F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*, *dcm*, (DE3)

Invitrogen

JM109 F['], *traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, Δ(*lacZ*)M15/, Δ(*lac-proAB*), *glnV44*, e14⁻, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi*, *hsdR17*

New England Biolabs

M15 [pREP4] Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

Qiagen

MC1061 *hadR*, *hsdM*⁺, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, Δ*lacX74*, *galU*, *galK*, *rpsL*,(Km^r)MC4100 F⁻ *araD139*, Δ(*argF-lac*)U169, *rpsL150*, (Str^r), *relA1*, *flbB5301*, *deoC1*,*ptsF25*, *rbsR*

DSM

XL1Blue *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *relA1*, *supE44*, *lac*, [F[']*proAB*, *lacI*^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)

Stratagene

S-17-1 Simon *et al.*, 1983

2.9.2 *R. capsulatus*

| | |
|----------------------------|---|
| SB1003 | Wildtyp; Taylor <i>et al.</i> , 1983 |
| MS01 | Chromosomale Deletion des <i>regA</i> Gens durch eine Kanamycin-Resistenzkassette in <i>R. capsulatus</i> SB1003; Sganga und Bauer, 1992 |
| CSM01 | Chromosomale Deletion des <i>regB</i> Gens durch eine Kanamycin-Resistenzkassette in <i>R. capsulatus</i> SB1003; Mosley <i>et al.</i> 1994 |
| SB1003 Δ ntrX | Derivat von <i>R. capsulatus</i> SB1003; <i>ntrX</i> durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette inaktiviert; diese Arbeit |
| Δ RC6 | <i>puf</i> -Deletionsmutante; Chen <i>et al.</i> , 1988 |
| Δ RC6 Δ ntrX | Derivat von <i>R. capsulatus</i> Δ RC6; <i>ntrX</i> durch Insertion einer Gentamycin-Resistenzkassette inaktiviert; diese Arbeit |

2.9.3 *S. cerevisiae*

| | |
|-------|--|
| AH109 | ADE2, HIS3, <i>lacZ</i> , MAT a, <i>trp1</i> , <i>leu2</i> Clontech |
| Y187 | <i>lacZ</i> , MAT α , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> Clontech |

2.10 Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|-------------------------|--|-----------------------------------|
| pGEX-4T-1 | Amp ^r , trägt Glutathion-S-Transferase Gen vor MCS; 4969 bp | Amersham Pharmacia |
| pGEX- <i>ntrX</i> | Siehe pGEX-4T-1; trägt das <i>ntrX</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> SB1003 (<i>insert</i> von 1628 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I Schnittstellen der MCS des Plasmids; IPTG-induzierbare Expression von GST-NtrX aus <i>R. capsulatus</i> | Diese Arbeit |
| pQE- <i>regA</i> | Derivat von pQE-30 (Qiagen); trägt <i>regA</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> ; N-terminale Fusion mit His-6-tag; zur IPTG-induzierbaren Expression von RegA in M15 [pREP4] | Hemschemeier <i>et al.</i> , 2000 |
| pET29CBD- <i>regA</i> * | Plasmid trägt <i>regA</i> * Gen; vermittelt Km-Resistenz | Du <i>et al.</i> , 1998 |
| pRK415 | Klonierungsvektor mit breit-tem Wirtsspektrum, repliziert in <i>E. coli</i> und <i>R. capsulatus</i> ; vermittelt Tc-Resistenz | Keen <i>et al.</i> , 1988 |
| pRK4- <i>regA</i> | Siehe pRK415; trägt das <i>regA</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> SB1003. Die Klonierung erfolgte über die <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I Schnittstellen der MCS des Plasmids; Expression von RegA aus <i>R. capsulatus</i> | Jäger; unveröffentlicht |

| | | |
|------------------------|--|-----------------------------------|
| pRK4- <i>regB</i> | Siehe pRK415; trägt das <i>regB</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> SB1003. Die Klonierung erfolgte über die <i>HindIII</i> und <i>XbaI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; Expression von RegB aus <i>R. capsulatus</i> ; | Jäger; unveröffentlicht |
| pRK4- <i>ntrX</i> | Siehe pRK415; trägt das <i>ntrX</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> SB1003 (<i>insert</i> von 1672 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>HindIII</i> und <i>KpnI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; Expression von NtrX aus <i>R. capsulatus</i> | Diese Arbeit |
| pRK4- <i>regA/regB</i> | Siehe pRK4 <i>regB</i> ; trägt zusätzlich das <i>regA</i> Gen aus pRK4 <i>regA</i> (<i>insert</i> von 900 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; Expression von RegA und RegB aus <i>R. capsulatus</i> | Diese Arbeit |
| pRK4- <i>regA</i> * | Siehe pRK415; trägt das <i>regA</i> * Gen aus pET29CBD- <i>regA</i> * (<i>insert</i> von 550 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids. Anschließend erfolgte die Einfügung der <i>upstream</i> Region des <i>regA</i> Gens aus dem Plasmid pRK4- <i>regA</i> über die Schnittstellen <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> . Expression von RegA* aus pET29CBD- <i>regA</i> * | Diese Arbeit |
| pBBR-1 MCS-2 | Plasmid, das sowohl von <i>R. capsulatus</i> als auch von <i>E. coli</i> repliziert wird; trägt IPTG-induzierbaren <i>lac</i> -Promotor | Kovach <i>et al.</i> , 1995 |
| pBBR- <i>rpoA</i> | siehe pBBR1 <i>MCS2</i> ; enthält <i>rpoA</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 500 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> Schnittstelle des Plasmids | Diese Arbeit |
| pLH-II-Z-omega | <i>pucB-lacZ</i> -Fusion; Plasmid vermittelt Amp- und Sp-Resistenz | Sganga und Bauer, 1992 |
| pWTSA- <i>lacZ</i> | <i>pufQBA-lacZ</i> -Fusion; Derivat von pRK415; vermittelt Tc-Resistenz | Hemschemeier <i>et al.</i> , 2000 |
| pCX34 | 3,8 kb <i>puf</i> -Wildtyp-Fragment aus <i>R. capsulatus</i> ; einkloniert in pUC19; vermittelt Amp-Resistenz | Klug und Cohen, 1988 |
| pG3EP4,5 | 4,5 kb <i>puc</i> -Wildtyp-Fragment aus <i>R. capsulatus</i> einkloniert in pGEM; vermittelt Amp-Resistenz | Tichy <i>et al.</i> , 1989 |
| pGAD-T7 | Klonierungsvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; Amp ^r , Leu ⁺ | Clontech |
| pGAD-T7-T | Kontrollvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; enthält Sequenz des SV40 T-Antigen fusioniert an GAL4-AD; Amp ^r ; Leu ⁺ | Clontech |

| | | |
|--------------------------|---|--------------|
| pGBK-T7 | Klonierungsvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; Km ^r , Trp ⁺ | Clontech |
| pGBK-T7-53 | Kontrollvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; enthält <i>p53</i> Gen; Km ^r , Trp ⁺ | Clontech |
| pGBK-T7- <i>lam</i> | Kontrollvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; enthält Gen für LaminC; Km ^r , Trp ⁺ | Clontech |
| pCL1 | Kontrollvektor für das Hefe 2-Hybridsystem; enthält die Sequenz für das komplette GAL4-Protein; Amp ^r , Leu ⁺ | Clontech |
| pGAD-T7- <i>regA</i> | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>regA</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 550 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>EcoRI</i> Schnittstelle der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegA im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>regA</i> * | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>regA</i> * Gen aus pGAD-T7- <i>regA</i> *-lang (<i>insert</i> von 550 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegA* im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>regB</i> | Siehe pGAD-T7; trägt die Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von RegB aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 900 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>EcoRI</i> Schnittstelle der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegB im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD- <i>ntrX</i> -Nr.46 | Siehe pGAD-T7; Genbank-Klon; trägt einen Teil des <i>ntrX</i> Gens aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 1400 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> Schnittstelle der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von NtrX im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>ntrX</i> | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>ntrX</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 1680 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegA im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGBK-T7- <i>regA</i> | Siehe pGBK-T7; trägt das <i>regA</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 550 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>EcoRI</i> Schnittstelle der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegA im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |

| | | |
|-----------------------------|--|--------------|
| pGAD-T7- <i>regA</i> *-lang | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>regA</i> * Gen aus pET29CBD- <i>regA</i> * (<i>insert</i> von 1800 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Klonierung von RegA* in pGAD-T7 und pGBK-T7 | Diese Arbeit |
| pGBK-T7- <i>regA</i> * | Siehe pGBK-T7; trägt das <i>regA</i> * Gen aus pGAD-T7- <i>regA</i> *-lang (<i>insert</i> von 550 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegA* im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGBK-T7- <i>regB</i> | Siehe pGBK-T7; trägt die Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von RegB aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 900 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>EcoRI</i> Schnittstelle der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von RegB im 2-Hybrid-system | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>nifD</i> | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>nifD</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 1639 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> und <i>ClaI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von NifD im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>nifH</i> | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>nifH</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 998 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von NifH im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>nifH2</i> | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>nifH2</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 890 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>EcoRI</i> Schnittstelle der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von NifH2 im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGAD-T7- <i>anfD</i> | Siehe pGAD-T7; trägt das <i>anfD</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 1605 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> und <i>BglII</i> Schnitt-stellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von AnfD im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pGBK-T7- <i>bchB</i> | Siehe pGBK-T7; trägt das <i>bchB</i> Gen aus <i>R. capsulatus</i> (<i>insert</i> von 1690 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>BamHI</i> und <i>ClaI</i> Schnittstellen der <i>MCS</i> des Plasmids; zur Untersuchung von BchB im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |

| | | |
|------------------------------|---|--|
| pGAD-T7- <i>bchB</i> -Domäne | Siehe pGAD-T7; trägt die Sequenz der Nitrogenase-Oxidoreduktase-Domäne von BchB aus <i>R. capsulatus</i> (insert von 622 bp). Die Klonierung erfolgte über die <i>Bam</i> HI und <i>Cla</i> I Schnittstellen der MCS des Plasmids; zur Untersuchung von BchB im 2-Hybridsystem | Diese Arbeit |
| pPHU-281 | <i>suicide</i> -Plasmid für <i>R. capsulatus</i> ; ist nicht zur Replikation in <i>R. capsulatus</i> befähigt; vermittelt Tc-Resistenz | Hübner <i>et al.</i> , 1993 |
| pPHU-281- <i>ntrX</i> | siehe pPHU-281; trägt flankierende homologe Bereiche des <i>ntrX</i> Gens aus <i>R. capsulatus</i> . Die Klonierung der beiden Bereiche erfolgte über die Schnittstellen <i>Hind</i> III und <i>Bam</i> HI (insert von 666 bp) und über <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I (insert von 526 bp). Anschließend wurde die Km-Resistenzkassette über die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle einkloniert. | Diese Arbeit |
| pRK2013 | Helferplasmid für die Konjugation; trägt <i>tra</i> -Gene; Km ^r | Figurski und Helsinki; 1979 |
| pDG9-3II | 2,6 kb <i>Eco</i> RI-Fragment mit Gm-Kassette apolar im <i>ntrX</i> Gen; vermittelt Gm-Resistenz | Giaourakis und Klipp; unveröffentlicht |

2.11 Oligonukleotide

Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen innerhalb der Oligonukleotide wurden unterstrichen.

5'-AD 5' GAAGATACCCCACCAAACCC 3'

20 nt; Sequenzier-*primer*; komplementär zur Position 1870 des Plasmids pGAD-T7; *sense*

3'-AD 5' AGATGGTGCACGATGCACAG 3'

20 nt; Sequenzier-*primer*; komplementär zur Position 2102 des Plasmids pGAD-T7; *antisense*

5'-BD 5' TCATCGGAAGAGAGTAG 3'

17 nt; Sequenzier-*primer*; komplementär zur Position 1155 des Plasmids pGBK-T7; *sense*

| | | | |
|---|----|----------------------------|----|
| 3'-BD | 5' | TAAGAGTCACTTTAAAAT | 3' |
| 18 nt; Sequenzier- <i>primer</i> ; komplementär zur Position 1495 des Plasmids pGBK-T7; <i>antisense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -49 | 5' | CGGGATCCTCGATCGTCAAGAAG | 3' |
| 23 nt; <i>Bam</i> HI-Schnittstelle; komplementär zur Position -151 <i>upstream</i> vom Translationsstart des <i>ntrX</i> Gens; <i>sense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -77 | 5' | CCCAAGCTTATGGCGGCATGCTGGT | 3' |
| 25 nt; <i>Hind</i> III-Schnittstelle; komplementär zur Position -123 <i>upstream</i> vom Translationsstart des <i>ntrX</i> Gens; <i>sense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -201 | 5' | CGGGATCCATGAGCGACATTCTCATC | 3' |
| 25 nt; <i>Kpn</i> I-Schnittstelle; komplementär zur Position 1549 im <i>ntrX</i> Gen; <i>sense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -743 | 5 | CGGGATCCGTAACGCGCCGCCGATT | 3' |
| 25 nt; <i>Bam</i> HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 543 im <i>ntrX</i> Gen; <i>antisense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -1223 | 5' | CGGGATCCGGTGGCCAGCCTGCAGA | 3' |
| 25 nt; <i>Bam</i> HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 1023 im <i>ntrX</i> Gen; <i>sense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -1729 | 5' | CCGCTCGAGTTCCAGCCAAAAAG | 3' |
| 23 nt; <i>Xho</i> I-Schnittstelle; komplementär zur Position 98 <i>downstream</i> des Stopcodons des <i>ntrX</i> Gens; <i>antisense</i> | | | |
| <i>ntrX</i> -1749 | 5' | GGGGTACCATGCGCAAAGGTGCAAG | 3' |
| 25 nt; <i>Kpn</i> I-Schnittstelle; komplementär zur Position 118 <i>downstream</i> des Stopcodons des <i>ntrX</i> Gens; <i>antisense</i> | | | |
| <i>puf</i> -10 | 5' | CCCATGTAACCCATGAAGG | 3' |
| 19 nt; komplementär zur Position -10 <i>upstream</i> des Transkriptionsstarts des <i>puf</i> -Promotors | | | |
| <i>puf</i> -90 | 5' | GCCACGGCCCTGCGGCCTCG | 3' |
| 20 nt; komplementär zur Position -90 <i>upstream</i> des Transkriptionsstarts des <i>puf</i> -Promotors | | | |

puf-165 5' CGCCAAACTCGCCCTCTG 3'

18 nt; komplementär zur Position -165 *upstream* des Transkriptionsstarts des *puf*-Promotors

puf+141 5' AGCCGCCTGCGCATCCGC 3'

18 nt; komplementär zur Position +141 *downstream* des Transkriptionsstarts des *puf*-Promotors

puc -290 5' GGATCTGCGACAGGCTAACGC 3'

21 nt; komplementär zur Position -290 *upstream* des Transkriptionsstarts des *puc*-Promotors

puc +140 5' CGTCAGTCATTGTCCCGAATCC 3'

22 nt; komplementär zur Position +140 *downstream* des Transkriptionsstarts des *puc*-Promotors

D52N *sense* 5' TGATGATCCTCAACATCTGGCTCAA 3'

25 nt; zur Mutagenese des Aspartat 52 von NtrX aus *R. capsulatus* SB1003; der Aminosäure-Austausch von Aspartat zu Asparagin wird durch den Austausch der unterstrichenen Base von G nach A herbeigeführt ; komplementär zur Position 343 des *ntrX* Gens; *sense*

D52N *as* 5' TTGAGCCAGATGTTGAGGATCATCA 3'

25 nt; zur Mutagenese des Aspartat 52 von NtrX aus *R. capsulatus* SB1003; der Aminosäure-Austausch von Aspartat zu Asparagin wird durch den Austausch der unterstrichenen Base von C nach T herbeigeführt; komplementär zur Position 369 des *ntrX* Gens; *antisense*

D52E *sense* 5' TGATGATCCTCGAGATCTGGCTCAA 3'

25 nt; zur Mutagenese des Aspartat 52 von NtrX aus *R. capsulatus* SB1003; der Aminosäure-Austausch von Aspartat zu Glutamat wird durch den Austausch der unterstrichenen Base von C nach G herbeigeführt; komplementär zur Position 343 des *ntrX* Gens; *sense*

D52E *as* 5' TTGAGCCAGATCTCGAGGATCATCA 3'

25 nt; zur Mutagenese des Aspartat 52 von NtrX aus *R. capsulatus* SB1003; der Aminosäure-Austausch von Aspartat zu Glutamat wird durch den Austausch der unterstrichenen Base von G nach C herbeigeführt; komplementär zur Position 369 des *ntrX* Gens; *antisense*

- bchB*-84 5' CATGCCATGGGCCGGGTTGTTCTCG 3'
 25 nt; *Nco*I-Schnittstelle; komplementär zur Position -56 *upstream* des Translationsstarts des *bchB* Gens; *sense*
- bchB*-140 5' CCATCGATGCAATGAAGCTGACGCTCT 3'
 26 nt; *Cla*I-Schnittstelle; komplementär zur Position 1 (Translationsstart) des *bchB* Gens; *sense*
- bchB*-762 5' CGGGATCCTTGAAATGCGCCTGACC 3'
 25 nt; *Bam*HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 622 des *bchB* Gens; *antisense*
- bchB*-1801 5' CGGGATCCGCGGCATTGCTGGTCAAG 3'
 25 nt; *Bam*HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 85 *downstream* des Stopcodons des *bchB* Gens; *antisense*
- anfD*-199 5' GAAGATCTCGATGCCCTACCATGAGT 3'
 26 nt; *Bgl*II-Schnittstelle; komplementär zur Position -2 *upstream* des Translationsstarts des *anfD* Gens; *sense*
- anfD*-1804 5' CGGGATCCTGATATCGGTCATCTGTC 3'
 26 nt; *Bam*HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 20 *downstream* des Stopcodons des *anfD* Gens; *antisense*
- nifD*-187 5' CAATCGATAGGGAGCCAAAAGA 3'
 22 nt; *Cla*I-Schnittstelle; komplementär zur Position -24 *upstream* des Translationsstarts des *nifD*-Gens; *sense*
- nifD*-1826 5' CGGGATCCGAGCACCTTGTCAG 3'
 22 nt; *Bam*HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 120 *downstream* des Stopcodons des *nifD*-Gens; *antisense*
- nifH*-202 5' CGGGATCCTGGGCAAACCTCCGTCAGA 3'
 26 nt; *Bam*HI-Schnittstelle; komplementär zur Position 2 des *nifH*-Gens; *sense*
- nifH*-1200 5' ATCAGGTTCTCGAGGTCTTC 3'
 20 nt; *Xho*I-Schnittstelle; komplementär zur Position 112 *downstream* des Stopcodons des *nifH*-Gens; *antisense*

nifH2-195 5' GGAATTCAGCCCCGTGAGCATCCAG 3'

25 nt; *EcoRI*-Schnittstelle; komplementär zur Position -6 *upstream* des Translationsstarts des *nifH2*-Gens; *sense* (*nifH2* entspricht RRC 1294)

nifH2-1085 5' CGAATTCGACGGGCCATCTTACGC 3'

25 nt; *EcoRI*-Schnittstelle; komplementär zur Position 10 *downstream* des Stopcodons des *nifH2*-Gens; *antisense* (*nifH2* entspricht RRC 1294)

regA-end 5' CGGGATCCTCATCGCGGGCTTGCGTTTGGCCAA 3'

33 nt; *BamHI*-Schnittstelle; komplementär zur Position 555 des *regA* Gens; *antisense*

pGAD-T7-HA5' GCTCTAGACCAGATTACGCTCATATG 3'

26 nt; *XbaI*- und *NdeI*-Schnittstelle; komplementär zur Position 1957 des Plasmids pGAD-T7; *sense*

regA-up 5' GGATCCGAAGCTTGGC 3'

16 nt; *HindIII*-Schnittstelle; komplementär zur Position -185 *upstream* des Translationsstarts des *regA* Gens; *sense*

regA-start 5' GGAATTCATATGGGCTCCCCCCTTTCACCC 3'

31 nt; *NdeI*-Schnittstelle; komplementär zur Position 1 des *regA* Gens; *antisense*

rpoA-up 5' CGGGATCCTTTTCCTCGGGCGTTC 3'

24 nt; *BamHI*-Schnittstelle; komplementär zur Position -44 *upstream* vom Translationsstart des *rpoA* Gens; *sense*

rpoA-down 5' CGGATCCCCGGAGCGGTTCTTTGT 3'

24 nt; *BamHI*-Schnittstelle; komplementär zur Position 53 *downstream* des Stopcodons des *rpoA* Gens; *antisense*

2.12 Puffer

Die Zusammensetzung aller nicht gesondert aufgeführten Puffer wird im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode beschrieben.

2.12.1 Enzympuffer

Alle Enzympuffer werden von der jeweiligen Firma als 10x beziehungsweise 5x Puffer geliefert. Sie werden so verwendet, dass sie im Reaktionsansatz 1x konzentriert vorliegen. Nicht aufgeführt sind die Puffer für Restriktionsendonukleasen und *Taq*-Polymerase. Sie werden ebenfalls 10x oder 5x konzentriert geliefert und nach Angaben der herstellenden Firma verwendet.

Shrimps Alkalische Phosphatase Puffer (10x)

200 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₃
pH 8,0

T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)

660 mM Tris-HCl
50 mM MgCl₂
10 mM DTT
10 mM ATP
pH 7,5

Polynukleotidkinase-Puffer (10x)

700 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₂
50 mM DTT
pH 7,6

ThermoPol-Reaktionspuffer (10x)

100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
200 mM Tris-HCl
20 mM MgSO₄
0,1 % Triton X-100

2.12.2 Auftragspuffer

DNA-Probenpuffer

4 M Harnstoff
50 % Saccharose
50 mM EDTA
0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xylencyanol

| | | |
|-------------------------------|-------|----------------------------|
| <u>PAA-Gel-Auftragspuffer</u> | 20 | % Glycerin |
| | 125 | mM Tris pH 6,8 |
| | 5 | % β -Mercaptoethanol |
| | 2 | % SDS |
| | 0,015 | % Bromphenolblau |

2.12.3 Puffer für die Säulenchromatographie

2.12.3.1 Puffer zum Zellaufschluss für Ni-NTA-Affinitätschromatographie

| | | |
|-----------------------------|-----|--------------------|
| <u>Sonifizierungspuffer</u> | 50 | mM Tris-HCl pH 7,5 |
| | 250 | mM NaCl |

Zur Herstellung des Wasch- bzw. Elutionspuffers für die Säulenchromatographie werden dem Sonifizierungspuffer 20 mM bzw. 500 mM Imidazol zugesetzt. Die restliche Zusammensetzung und der pH-Wert bleiben unverändert.

2.12.3.2 Puffer für die Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie

| | | |
|----------------------------------|--------|---|
| <u>Puffer A</u> | 10 | mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,3 |
| | 150 | mM NaCl |
| | 0,025 | % Na-Azid |
| <u>Puffer B</u> | 100 | mM Glycin pH 2,8 |
| | 400 | mM NaCl |
| | 0,025 | % Na-Azid |
| <u>1 M Kaliumphosphat-Puffer</u> | 4,76 | g KH_2PO_4 |
| | 49,01 | g K_2HPO_4 |
| | ad 250 | ml ddH ₂ O |
| | | pH 8,0 |

2.12.3.3 Puffer für die Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie

| | | |
|------------------|-----|------------------------------|
| <u>PBS (10x)</u> | 1,4 | M NaCl |
| | 27 | mM KCl |
| | 101 | mM Na_2HPO_4 |
| | 0,1 | % Lubrol |
| | | pH 7,3 |

| | | |
|-----------------------|----|---------------------------|
| <u>Elutionspuffer</u> | 50 | mM Tris-HCl |
| | 10 | mM reduziertes Glutathion |
| | | pH 8,0 |

2.12.4 Elektrophorese-Puffer, *blot*-Puffer, Elutionspuffer

PBS

4 g NaCl
 0,1 g KCl
 0,72 g Na₂HPO₄
 0,12 g NaH₂PO₄
 ad 500 ml ddH₂O

pH 7,3 mit HCl einstellen

TAE (50x)

242 g Tris
 57,1 ml Eisessig
 100 ml EDTA

ad 1000 ml ddH₂O

TBE (10x)

890 mM Tris-HCl
 890 mM Borsäure
 25 mM EDTA

pH 8,3

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris-Cl pH 8,8

Sammelgel-Puffer

1 M Tris-Cl pH 6,8

SSC (20x)

173,8 g NaCl
 88,2 g Natriumcitrat x 2 H₂O
 ad 1000 ml ddH₂O

2.13 Medien

RÄ-Medium

3 g Äpfelsäure
 0,2 g MgSO₄ x 2 H₂O
 1,2 g (NH₄)₂SO₄
 0,07 g CaCl₂ x 2 H₂O
 1,5 ml Spurenelement-Lösung

ad 1000 ml H₂O; pH 6,9 mit NaOH einstellen und autoklavieren. Anschließend werden 20 ml Phosphat-Lösung und 8 ml Vitamin-Lösung zugegeben.

Spurenelement-Lösung

| | |
|------|--|
| 500 | mg Fe(II)-Citrat |
| 20 | mg MnCl ₂ x 4 H ₂ O |
| 5 | mg ZnCl ₂ |
| 5 | mg LiCl |
| 2,5 | g KBr |
| 2,5 | g KJ |
| 0,15 | mg CuSO ₄ |
| 1 | mg Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O |
| 5 | mg CoCl ₂ x 6 H ₂ O |
| 0,5 | mg SnCl ₂ x 2 H ₂ O |
| 0,5 | mg BaCl ₂ |
| 1 | mg AlCl ₃ |
| 10 | mg H ₃ BO ₄ |
| 20 | mg EDTA |

ad 1000 ml H₂O

Vitamin-Lösung

| | |
|-----|----------------|
| 200 | mg Niacin |
| 400 | mg Thiamin-HCl |
| 200 | mg Nicotinamid |
| 8 | mg Biotin |

ad 1000 ml H₂O

Phosphat-Lösung

| | |
|-----|-----------------------------------|
| 0,9 | g K ₂ HPO ₄ |
| 0,6 | g KH ₂ PO ₄ |

ad 1000 ml H₂O

Standard I-Medium

| | |
|----|--------------------------------|
| 25 | g Nährbouillon der Firma Merck |
|----|--------------------------------|

ad 1000 ml H₂O

YPAD-Medium

| | |
|----|------------------|
| 20 | g Pepton |
| 10 | g Hefeextrakt |
| 40 | mg Adenin-Sulfat |

ad 950 ml ddH₂O; pH 5,8 einstellen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf etwa 55°C werden 50 ml einer 40 %-igen Glucoselösung zugegeben.

SD-Medium

| | |
|-------|---|
| 6,7 | g Synthetisches <i>Dropout</i> Medium ohne Aminosäuren |
| 182,2 | g D-Sorbitol |

ad 850 ml ddH₂O; pH 5,8 einstellen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf etwa 55°C werden 100 ml einer 10x *Dropout*-Lösung und 50 ml einer 40 %-igen Glucoselösung zugegeben.

10x Dropout-Lösung

Die *Dropout*-Lösung enthält die für die Hefe essentiellen Aminosäuren. Je nach Zusammensetzung der *Dropout*-Lösung kann auf Hefestämme, die zur Synthese bestimmter Aminosäuren befähigt sind, selektiert werden.

| | | |
|---------------------------|------|------|
| L-Adenin Hemisulfat | 200 | mg/l |
| L-Arginin HCl | 200 | mg/l |
| L-Histidin HCl Monohydrat | 200 | mg/l |
| L-Isoleucin | 300 | mg/l |
| L-Leucin | 1000 | mg/l |
| L-Lysin HCl | 300 | mg/l |
| L-Phenylalanin | 500 | mg/l |
| L-Threonin | 2000 | mg/l |
| L-Tryptophan | 200 | mg/l |
| L-Valin | 1500 | mg/l |

Die Aminosäuren werden in ddH₂O gelöst und anschließend autoklaviert. Bei 4°C hält sich die *Dropout*-Lösung für etwa ein Jahr.

Agarplatten

500 ml des gewünschten Mediums
8-10 g Bacto-Agar
Aufkochen und autoklavieren

2.14 Geräte und weiteres Material

| | |
|---|--------------------------|
| Biostat® C | B. Braun Biotech |
| Chromatographieanlage (GradiFrac®) | Amersham Pharmacia |
| Chromatographiesäulen | Qiagen |
| Elektroporationsapparatur (<i>E. coli</i> Pulser) | Bio Rad |
| Elektroporationsküvetten | Bio Rad |
| Filterzelle | Millipore |
| Genetic Analyzer 310 | Applied Biosystems (ABI) |
| <i>Imaging plate</i> für <i>Molecular Imager</i> ® FX | Biorad |
| Kühlsystem f. Isoelektrische Focussierung | Pharmacia Biotech |
| Membran (positiv) | Appligene |
| Membranfilter 82 mm/0,45 µm | Schleicher & Schuell |
| <i>Molecular Imager</i> ® FX | Biorad |
| Multiphor II Elektrophorese | Pharmacia Biotech |
| Multiphor II Novablot | Pharmacia Biotech |
| Nitrocellulose Membranfilter 0,45 µm | Schleicher & Schuell |
| Nitrocellulosemembran (Protran) | Schleicher & Schuell |
| 3-MM Papier | Whatman |
| <i>Ready Strip</i> ™ IPG Strips; 11 cm, pH 4-7 | Biorad |
| Reinstwasseranlage Typ HP6 UV/UF | TKA |
| Röntgenfilme Kodak X-OMat XAR 5 | Eastman Kodak |
| Saugpapier MN40 | Macherey und Nagel |
| Semi-Trocken- <i>blot</i> -Apparatur Multiphor II | Amersham Pharmacia |
| Sterilfilter 0,2 µm | Nalgene |
| <i>Thermocycler</i> Trio-Thermoblock | Biometra |
| Ultraschallgerät Sonopuls GM70 (Sonifier) | Bandelin |

3 METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Plattenkulturen von *E. coli*

Mit Hilfe einer sterilen Glaspipette oder Impföse werden die Bakterien auf eine St.I-Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wird die Platte bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von Antibiotika zum Medium kann auf Stämme mit entsprechenden Resistenzgenen selektioniert werden.

3.1.2 Flüssigkulturen von *E. coli*

Erlenmeyerkolben oder Wassermannröhrchen werden zu 20-50 % ihres Nennvolumens mit flüssigem St.I-Medium gefüllt und mit Bakterien beimpft. Dieser Vorgang geschieht unter sterilen Bedingungen. Zur Selektion auf resistente Bakterienstämme können Antibiotika zugesetzt werden. Anschließend wird die Kultur bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler bei 180 rpm inkubiert.

3.1.3 Fermenteranzucht von *E. coli*

Die Fermentationsanlage wird mit 10 l St.I-Medium gefüllt und autoklaviert. Anschließend werden unter sterilen Bedingungen die erforderlichen Antibiotika und die Bakterien zugesetzt. Zusätzlich wird 1 ml eines Antischaum-Mittels (Desmophen; wassergesättigt) zugegeben. Die Anzucht erfolgt über Nacht bei 37°C unter ständigem Rühren bei 250 rpm. Weiterhin erfolgt eine Belüftung der Kultur mit 15 l O₂/min. Um die Zellen nach der Kultivierung zu konzentrieren, wird eine Filterzelle der Firma Millipore verwendet.

3.1.4 Plattenkulturen von *R. capsulatus*

Die Bakterien werden mit einer Impföse unter sterilen Bedingungen auf einer RÄ-Agarplatte ausgestrichen. Je nach Wachstumsbedingungen wird die Platte anschließend im Dunkeln bei 32°C oder anaerob bei Raumtemperatur im Licht (60W) für 2-3 Tage inkubiert.

3.1.5 Flüssigkulturen von *R. capsulatus*

3.1.5.1 Aerobes Wachstum

Ein Erlenmeyerkolben mit Schikane wird zu 10 % seines Nennvolumens mit RÄ-Medium gefüllt. Durch Zugabe entsprechender Antibiotika kann auf resistente Bakterienstämme selektioniert werden. Der mit Bakterien beimpfte Kolben wird dann über Nacht bei 32°C im Dunkeln auf einem Schüttler mit 140 rpm inkubiert. Der Sauerstoffpartialdruck beträgt unter diesen Bedingungen etwa 20 %.

3.1.5.2 Semiaerobes Wachstum

Der Sauerstoffpartialdruck einer semiaeroben Kultur sollte bei etwa 1-2 % liegen. Hierzu werden Erlenmeyerkolben zu etwa 70 % ihres Nennvolumens mit RÄ-Medium gefüllt. Nach erfolgter Beimpfung werden die Kolben bei 32°C im Dunkeln bei 140 rpm auf einem Schüttler inkubiert.

3.1.5.3 Phototrophes Wachstum

Eine Meplat-Flasche wird nahezu vollständig mit RÄ-Medium befüllt. Nach Zugabe entsprechender Antibiotika und Beimpfung mit Bakterien wird die Flasche gänzlich aufgefüllt. Die Bebrütung erfolgt bei Raumtemperatur unter Beleuchtung durch eine 60 W Glühlampe.

3.1.6 Plattenkulturen von *S. cerevisiae*

Die Hefen werden mit einer Impföse oder einer Pipette unter sterilen Bedingungen auf einer Platte ausgestrichen. Anschließend werden die Platten bei 30°C für mehrere Tage inkubiert. Durch die Auswahl der Aminosäuren im Agar kann auf plasmidtragende Stämme selektiert werden.

3.1.7 Flüssigkulturen von *S. cerevisiae*

Die Hefen werden mit einer Impföse unter sterilen Bedingungen von der Platte abgenommen und in einem Milliliter des entsprechenden Mediums resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension in einen mit Medium gefüllten Erlenmeyerkolben überführt und bei 32°C und 140 rpm auf einem Schüttler inkubiert.

3.1.8 Bestimmung der Gesamtzellzahl von Kulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt in der Regel mittels eines Photometers. Hierzu wird bei *S. cerevisiae* und *E. coli* bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Da bei *Rhodobacter* in diesem Bereich die Absorption von Photosynthesepigmenten interferiert, wird die optische Dichte von *Rhodobacter*-Kulturen bei 660 nm gemessen. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt:

| | | |
|---------------------------------|-----|--|
| <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 1 | OD ₆₆₀ entspricht circa 2×10^9 Zellen/ml |
| <i>Escherichia coli</i> | 1 | OD ₆₀₀ entspricht circa 5×10^8 Zellen/ml |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,1 | OD ₆₀₀ entspricht circa 1×10^6 Zellen/ml |

3.1.9 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen werden 2 ml *E. coli*- oder *S. cerevisiae*- bzw. 5 ml *Rhodobacter*-Kultur sedimentiert und die Zellen in einem Milliliter des entsprechenden Mediums ohne Antibiotika aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 ml 80 %-igem Glycerin wird die Dauerkultur in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kulturen werden anschließend bei -70°C gelagert und können bei Bedarf auf Agarplatten ausgestrichen werden.

3.1.10 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen zur Elektroporation

Diese Methode soll dazu dienen *E. coli* für die Elektroporation vorzubereiten. Hierbei muss die im Medium vorhandene hohe Salzkonzentration durch mehrere Waschschrte verringert werden. Ein zu hoher Salzanteil würde bei der Elektrotransformation zu einem Kurzschluss führen. Zur Herstellung kompetenter Zellen werden zwei 1000 ml-Erlenmeyerkolben mit je 500 ml St.I-Medium gefüllt und mit je 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Kolben werden bei 37°C unter Schütteln mit 180 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 bis 1 erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt wird die Kultur in Zentrifugenbecher überführt und für 15-30 min auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zellen für 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, und das Bakteriensediment wird mit 1 l sterilem kaltem ddH₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation werden die Zellen in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen. Anschließend wird das Zellsediment nach erneuter Zentrifugation in 20 ml kaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen und wieder zentrifugiert. Die Zellen werden dann in 4 ml 10 %-igem Glycerin aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die so

präparierten Zellen können nun direkt für eine Elektroporation verwendet oder bei -70°C für mehrere Monate gelagert werden.

3.1.11 Elektroporation von *E. coli*

Die Elektroporation wird dazu verwendet um Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen zu transformieren. Standardmäßig werden etwa 100 ng bis 200 ng Plasmid-DNA auf Eis mit 40 µl der vorbereiteten kompetenten Zellen gemischt. Der Ansatz wird in eine vorgekühlte Transformationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt bei 1,8 kV. Direkt nach der Transformation wird der Ansatz mit 0,5 ml St.I-Medium gemischt und in ein Wassermannröhrchen überführt. Die Röhrchen werden dann für 1 bis 3 Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden je 100 µl auf St.I-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Falls größere DNA-Mengen oder Ligationsansätze transformiert werden sollen, kann vor der Transformation eine Ethanol-fällung durchgeführt werden. Hierzu wird der Ansatz auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl Natriumacetat pH 5,2 und 250 µl eiskaltem Ethanol versetzt. Nach kurzem Mischen wird die Fällung für 15 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Präzipitat wird mit 100 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend kurz getrocknet. Die DNA wird in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Hiervon werden 10 µl für die Transformation eingesetzt.

3.1.12 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen zur Hitzeschock-Transformation

Wenn *E. coli* Zellen bereits ein Plasmid enthalten und noch ein zweites Plasmid in der Zelle etabliert werden soll, so ist es in der Regel angebracht, die Hitzeschock-Transformation zu verwenden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock-Transformation werden 500 ml St.I-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Zellen werden bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert, bis sie eine optische Dichte von etwa OD₆₀₀ = 0,5 erreicht haben. Die Zellen werden dann in Zentrifugenbecher überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 min. Das Zellsediment wird in 150 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation werden die Zellen in 4 ml kaltem TFB2-Puffer aufgenommen und aliquotiert. Für eine Transformation werden 100 µl kompetente Zellen benötigt.

| | | |
|---|--------|-------------------|
| <u>TFB1-Puffer:</u> | 100 mM | RbCl |
| | 50 mM | MnCl ₂ |
| | 30 mM | Kaliumacetat |
| | 10 mM | CaCl ₂ |
| | 15 % | Glycerol |
| pH 5,8 einstellen und steril filtrieren | | |

| | | |
|---|-------|-------------------|
| <u>TFB2-Puffer:</u> | 10 mM | MOPS |
| | 10 mM | RbCl |
| | 75 mM | CaCl ₂ |
| | 15 % | Glycerol |
| pH 8,0 mit KOH einstellen und steril filtrieren | | |

3.1.13 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Die Hitzeschock-Transformation wird dazu verwendet, Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen einzubringen, insbesondere, wenn die *E. coli* Zelle bereits ein Plasmid enthält. Hierzu werden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen mit 100 ng Plasmid-DNA in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Die Zellsuspension wird gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock für 90 s bei 42°C in einem Wasserbad. Danach werden 500 µl St.I-Medium mit den transformierten Zellen gemischt, und der Ansatz wird bei 37°C auf einem Schüttler mit 180 rpm inkubiert. Nach 60-90 min werden 100 µl des Ansatzes auf einer St.I-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.14 Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* zur Transformation

Zur Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* für die Hitzeschock-Transformation werden mehrere Kolonien der Hefe in 1 ml YPAD-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPAD überführt. Die Kultur wird über Nacht bei 32°C auf einem Schüttler mit 140 rpm inkubiert. Am nächsten Tag sollte die OD₆₀₀ bei etwa 1,5 liegen. 300 ml frisches YPAD-Medium werden mit genügender Menge Übernachtskultur beimpft, um eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 zu erreichen. Die Zellen werden dann für etwa 3 h bei 30°C mit 140 rpm geschüttelt. Danach werden die Zellen für 5 min mit 1000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, und das resultierende Zellsediment wird in 50 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation werden die Zellen in 1 ml ddH₂O aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Sediment in 1,5 ml frisch hergestelltem sterilem TE/LiAc resuspendiert und für 15 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach diesem Schritt sind die Hefen für die Transformation vorbereitet und können für einige Stunden

bei Raumtemperatur gelagert werden. Im Gegensatz zu *E. coli* Zellen ist es nicht möglich, kompetente Hefezellen über einen längeren Zeitraum bei -80°C zu lagern. Die kompetenten Zellen müssen vor jeder Transformation frisch hergestellt werden.

Sollten die kompetenten Zellen zur Transformation einer Genbank im Rahmen eines 2-Hybrid-Experiments benutzt werden, dann wird 1 l Kultur zur Herstellung kompetenter Zellen eingesetzt. Zusätzlich sollten die Zellen für dieses Experiment sehr frisch sein, weshalb eine Lagerung für mehr als eine Stunde nach der Fertigstellung nicht ratsam ist.

| | | |
|-----------------------|--------------------|---|
| <u>Stocklösungen:</u> | 10x TE | 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7,5 |
| | 10x LiAc | 1 M LiAc; pH 7,5 einstellen mit verdünnter Essigsäure |
| <u>TE/LiAc</u> | 10x TE | 1 ml |
| | 10x LiAc | 1 ml |
| | ddH ₂ O | 8 ml |

3.1.15 Transformation von *S. cerevisiae*

Mit Hilfe der LiAc-Transformation kann externe Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* etabliert werden. Bei der hier beschriebenen Methode werden zwei verschiedene Plasmide in einem Schritt in die Hefe transformiert. Auf Eis werden jeweils 0,1 µg bis 0,5 µg Plasmid-DNA mit 0,1-0,2 mg Lachssperma-DNA gemischt. Diese sogenannte *Carrier*-DNA wird vorher für 20 min bei 95°C gekocht und auf Eis abgekühlt. Anschließend gibt man 100 µl der frisch hergestellten kompetenten Zellen zum DNA-Gemisch. Nach Hinzufügen von 600 µl einer frischen PEG/LiAc-Lösung vortext man kurz und inkubiert den Ansatz dann für 30 min bei 30°C im Wasserbad. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C für 20 min ebenfalls im Wasserbad. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis werden die Ansätze 2 min bei 1000 g zentrifugiert, und der Überstand wird abgenommen. Das Zellsediment wird in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden dann auf SD-Agarplatten mit entsprechenden Aminosäuren ausgestrichen und für 3 bis 7 Tage bei 30°C inkubiert. Für die Transformation einer Genbank in *S. cerevisiae* werden entsprechend größere Mengen der einzelnen Bestandteile eingesetzt. Hierfür verwendet man 1 mg DNA des entsprechenden GAL4-Bindedomänen-Konstrukts und etwa 0,5 mg des Aktivator-domänen-Konstrukts. Zusätzlich werden 20 mg *Carrier*-DNA benötigt. Nach Zugabe von 8 ml kompetenten Zellen und 60 ml PEG/LiAc-Lösung wird der Ansatz für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Der

Hitzeschock erfolgt für 15 min bei 42°C im Wasserbad. Auch hier sollte der Ansatz gelegentlich geschüttelt werden. Nach dem Hitzeschock werden die Zellen auf Eis abgekühlt und anschließend in der Zentrifuge bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wird in 10 ml TE aufgenommen und jeweils 200 µl auf die entsprechenden SD-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt wie oben beschrieben bei 30°C für 3 bis 7 Tage.

| | | |
|-----------------------|---------------|---|
| <u>Stocklösungen:</u> | 50 % PEG 3350 | Polyethylenglycol, <i>avg. mol. wt.</i> = 3350 |
| | 10x TE | 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7,5 |
| | 10x LiAc | 1 M LiAc; pH 7,5 einstellen mit verdünnter Essigsäure |
| <u>PEG/LiAc</u> | 50 % PEG | 8 ml |
| | 10x TE | 1 ml |
| | 10x LiAc | 1 ml |

3.1.16 Mating von *S. cerevisiae*

Bei diesem Test macht man sich die Tatsache zunutze, dass haploide Hefezellen als zwei verschiedene Paarungstypen vorliegen können. Diese beiden Paarungstypen können unter entsprechenden Bedingungen zu einer diploiden Zygote verschmelzen, die ihrerseits wieder diploide Tochterzellen produziert. Wenn die beiden Paarungstypen Träger unterschiedlicher Plasmide sind, enthält die diploide Zygote nach der Verschmelzung auch beide Plasmide der Ausgangszellen. Mit dieser Methode kann man prüfen, ob ein im 2-Hybridsystem gefundener Klon eine spezifische Interaktion mit dem getesteten Protein aufweist, oder ob das gefundene Protein bereits alleine in der Lage ist, die Reportergene im Hefegenom zu aktivieren. Der Hefestamm Y187 wurde mit drei verschiedenen Plasmiden transformiert: pGBKT7, pGBKT7-*lam*, pGBKT7-*regA*. Der Hefestamm AH109 wurde mit den im 2-Hybridsystem gefundenen Aktivator-domänen-Konstrukten transformiert. Anschließend wurden in einer 96-*well* Mikrotiterplatte 200 µl YPAD-Medium mit den beiden Hefestämmen beimpft und für 24 h unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Hefen auf zwei verschiedene SD-Platten ausgestrichen. Zum einen verwendet man SD ohne Leucin und ohne Tryptophan (SD –LT); hier können Hefen wachsen, die beide Ausgangsplasmide enthalten. Zum anderen werden die Hefen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin plattiert. Auf diesen Platten sind nur Hefen zum

Wachstum befähigt, die eine Interaktion der beiden exprimierten Hybridproteine zeigen. Nach drei bis sieben Tagen Inkubation bei 30°C sind die Hefen gewachsen.

3.1.17 Konjugation von Plasmiden nach *R. capsulatus*

Rhodobacter capsulatus gilt als schlecht transformierbar, deshalb müssen Plasmide aus *E. coli* mittels di- oder triparentaler Konjugation in diesen Organismus eingebracht werden (Klug und Drews, 1984). Die verwendeten Plasmide besitzen durch ihr Replikon eine breite Wirtsspezifität und tragen die *mob*-Region (*mobilization*). Diese codiert unter anderem für ein Mobilisierungsprotein, das den zum Transfer notwendigen Einzelstrangbruch des Plasmids einleitet. Für die Konjugation werden weiterhin die *tra*-Gene benötigt. Diese werden bei der triparentalen Konjugation von dem Plasmid des sog. Helferstammes HB101 (pRK2013) bereitgestellt. Die insgesamt 25 Gene innerhalb des *tra*-Operons sind unter anderem für den Aufbau der F-Pili zuständig, die den zum Plasmidtransfer essentiellen Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzelle herstellen. Bei der diparentalen Konjugation werden die *tra*-Gene vom *E. coli* Donorstamm S17-1 codiert.

Für die Konjugation von replizierenden Plasmiden nach *Rhodobacter capsulatus* wurde meist die triparentale Konjugation eingesetzt. Hierzu werden 500 µl einer Übernachtskultur des Rezipientenstammes mit 500 µl einer Übernachtskultur des Helferstammes gemischt. Anschließend werden weitere 500 µl einer Übernachtskultur des *E. coli* Donorstammes hinzugefügt. Die Zellsuspension wird durch dreiminütige Zentrifugation bei 8000 rpm sedimentiert. Die Zellen werden in etwa 100 µl RÄ-Medium resuspendiert und steril auf einen Nitrocellulose-Membranfilter überführt, der sich auf einer PY-Agarplatte befindet. Nach 3-5 h Inkubation werden die Zellen in 1 ml RÄ-Medium resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungen auf Selektiv-Agar ausgestrichen. Als Kontrolle dient ein Konjugationsansatz, der lediglich Rezipienten- und Helferstamm enthält.

Für die Konjugation sogenannter Suizidplasmide, die nicht in *Rhodobacter* replizieren können, wurde in dieser Arbeit die diparentale Konjugation eingesetzt. Eine Übernachtskultur von *E. coli* S17-1 wird am nächsten Tag 1 : 20 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4-0,6 weiterinkubiert. 3 x 10⁹ Zellen einer Übernachtskultur des Rezipientenstammes SB1003 werden mit 3 x 10⁸ Zellen des Donorstammes S17-1 (mit entsprechendem Suizidplasmid) gemischt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 6000 rpm werden die Zellen in 1 ml RÄ-Medium steril resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die

Zellen werden in 100 µl RÄ-Medium aufgenommen und auf einen Nitrocellulose-Membranfilter überführt, der auf einer PY-Agarplatte liegt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt über Nacht bei 32°C. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen mit 1 ml RÄ-Medium vom Filter gewaschen und jeweils 100 µl auf die entsprechenden Selektiv-Agarplatten ausgestrichen.

3.1.18 Gesamtzell-Absorptions-Spektren von *R. capsulatus*

Zur Bestimmung von Ganzzell-Absorptionsspektren von *Rhodobacter capsulatus* werden 750 µl einer semiaeroben oder phototrophen Übernachtskultur mit 250 µl 80 %-igem Glycerin versetzt. Die Probe wird durch Vortexen gemischt und in eine Küvette gefüllt. Das Spektrum wird im Photometer von 900-500 nm aufgenommen. In diesem Wellenlängenbereich weisen die Pigment-Protein-Komplexe von *R. capsulatus* ihre charakteristischen Absorptionsmaxima auf. Zur vergleichenden quantitativen Auswertung der Absorptionsspektren werden die Bereiche des Spektrums, die den *peak* bei etwa 803 nm (*peak* LH-I / RC) und den *peak* bei etwa 859 nm (*peak* LH-I / LH-II) enthalten, ausgeschnitten und auf einer Feinwaage gewogen. Da die Menge an Photosynthese-(PS)-Komplexen proportional zur Fläche des jeweiligen *peaks* ist, kann anhand des Gewichts des ausgeschnittenen Papiers eine Aussage über die Menge an PS-Komplexen gemacht werden. Das Gewicht der Papierfläche des Wildtyp *peaks* wird hierbei auf 100 % gesetzt und mit dem jeweiligen Gewicht der Papierfläche des *peaks* der Mutante in Relation gesetzt.

3.1.19 Zellfreie Extrakte von *R. capsulatus*

Zur Herstellung zellfreier Extrakte zur Bestimmung von Absorptionsspektren werden 30 ml einer semiaeroben *R. capsulatus* Übernachtskultur für 15 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 1 ml Stop-Puffer aufgenommen und dreimalig für 3 min bei 60 % Intensität sonifiziert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm zur Sedimentation der Zellbruchstücke. Der Überstand enthält die Photosynthese-Komplexe und kann zur Bestimmung eines Absorptionsspektrums eingesetzt werden.

| | | |
|---------------------|-------|------------------|
| <u>Stop-Puffer:</u> | 25 mM | Tris-HCl, pH 7,6 |
| | 5 mM | EDTA |
| | 50 mM | NaCl |

3.1.20 *In vivo* ³⁵S-Methionin Markierung von Proteinen in *R. capsulatus*

Von einer semiaerob angezogenen *R. capsulatus* Kultur werden 4 ml abgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Durch die Zugabe von 30 µCi L-³⁵S-Methionin wird die *in vivo* Markierung gestartet. Nach 10 min wird die Reaktion beendet, und 10 µl der Suspension werden in 1 ml Szintillationsflüssigkeit verdünnt und im Szintillationszähler gemessen. Die Zellen werden bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. 10 µl des Überstandes werden ebenfalls in 1 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen. Anhand der beiden Messwerte kann die eingebaute Menge ³⁵S-Methionin bestimmt werden. Die Zellen können an dieser Stelle bei -80°C eingefroren oder für die 2D-Gelelektrophorese weiterverwendet werden.

3.1.21 Überexpression von Fremdprotein in *E. coli*

Zur Überexpression von Fremdprotein in *E. coli* wird das entsprechende Gen unter die Kontrolle eines starken, IPTG-induzierbaren Promotors gebracht, der sich auf einem artifiziellen Expressionsplasmid befindet. Hierdurch kann die Expression des Proteins durch Zugabe von IPTG zur Bakteriensuspension induziert werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Plasmide verwendet: pQE-30 (Qiagen) und pGEX-4T1 (Pharmacia). Beide Plasmide werden zur Expression in unterschiedliche Bakterienstämme eingebracht. Hierfür dient *E. coli* M15(pREP4) im Falle des pQE-30-Plasmids und BL21 im Falle des pGEX-4T1-Plasmids. 50 ml St.I-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin werden mit *E. coli* BL21 (pGEX-4T1-*ntrX*) inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Bei Verwendung von *E. coli* M15 (pREP4, pQE-*regA*) werden dem Medium zusätzlich 25 µg/ml Kanamycin beigegeben.

Am darauffolgenden Tag wird 1 l St.I-Medium mit der Übernachtskultur versetzt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-1,0 inkubiert. Danach erfolgt die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiteren zwei bis drei Stunden Inkubation bei 37°C unter Schütteln werden die Zellen bei 5000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Das Sediment wird gewogen und anschließend bei -70°C bis zur Aufarbeitung der Proteine gelagert.

3.2 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.2.1 Plasmidisolierung

Die hier verwendete Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

3.2.1.1 Minipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* werden 2 ml Übernachtskultur angezogen. 1,5 ml dieser Kultur werden für 5 min bei 8000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 100 µl kalter Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Danach werden 200 µl Lösung II zugegeben, und die Suspension wird durch Schütteln gemischt. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wird der Ansatz erneut geschüttelt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA. Um die DNA aus der Lösung zu fällen, werden 40 µl 3 M Natrium-Acetat pH 5,2 und 1 ml eiskaltes Ethanol zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm wird das Präzipitat mit 100 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die gefällte Plasmid-DNA wird anschließend für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

| | | | |
|--------------------|-----------|---------------------|---------|
| <u>Lösung I:</u> | 50 mM | Glucose | |
| | 25 mM | Tris-HCl, pH 8,0 | |
| | 10 mM | EDTA, pH 8,0 | |
| | 100 µg/ml | RNase | |
| <u>Lösung II:</u> | 0,2 N | NaOH | |
| | 1 % | SDS | |
| <u>Lösung III:</u> | 3 M | Kaliumacetat: | 60 ml |
| | | Eisessig: | 11,5 ml |
| | | ddH ₂ O: | 28,5 ml |

3.2.1.2 Plasmid-Midipräparation

Diese hier beschriebene Präparation basiert auf einem Protokoll der Firma Qiagen, die auch die notwendigen Puffer und Säulen herstellt. Der Zellaufschluss beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Präparation werden 20-60 ml einer Bakterien-Übernachtskultur verwendet. Die Menge an Kultur hängt von der Kopienzahl des zu isolierenden Plasmids ab. Die Zellen werden für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert, und das Zellsediment wird anschließend nach Protokoll mit den

entsprechenden Puffern versetzt. Das DNA-Präzipitat wird nach 15-minütigem Trocknen bei Raumtemperatur in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

3.2.1.3 Megapräparation

Auch die hier geschilderte Präparation beruht auf einem Protokoll der Firma Qiagen. Die Methode dient zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA. Für die Aufarbeitung werden etwa 2 l einer Bakterien-Übernachtskultur abzentrifugiert. Die DNA-Isolierung folgt dem Protokoll der Firma Qiagen. Die erhaltene Plasmid-DNA wird bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Menge in 1-2 ml ddH₂O aufgenommen.

3.2.1.4 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Es ist nicht möglich, saubere Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* zu isolieren, da sich meist eine Kontamination mit chromosomaler DNA nicht verhindern lässt. Zur Aufreinigung der DNA werden Hefezellen von einer Agar-Platte abgenommen und in 200 µl Hefe-Lyse-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wird die Zellsuspension mit 200 µl Phenol/-Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und für 2 min gevortext. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min. Der Überstand wird abgenommen und die enthaltene Plasmid-DNA durch Ethanol-Präzipitation ausgefällt. Nach einmaligem Waschen mit 70 %-igem Ethanol kann die DNA getrocknet und in ddH₂O aufgenommen werden.

| | | |
|--------------------------|--------|------------------|
| <u>Hefe-Lyse-Lösung:</u> | 100 mM | NaCl |
| | 10 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1 mM | EDTA |
| | 1 % | SDS |
| | 2 % | Triton X-100 |

3.2.2 Präparation genomischer DNA aus *R. capsulatus*

Von einer *Rhodobacter capsulatus* Übernachtskultur werden 10 ml für 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 20 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Sediment in 500 µl SET-Puffer aufgenommen wurde, werden 1 mg/ml Lysozym hinzugefügt und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 1 mg/ml Proteinase K und eine zweistündige Inkubation bei 50°C im Wasserbad. Die Proben werden mit 1/10 Volumen 6 M NaCl und 1 Volumen Chloroform versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenmischer gerollt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min erkennt man eine

gefärbte und eine klare Phase. Die ungefärbte obere Phase wird mit einer abgeschnittenen blauen Spitze abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation der DNA aus dieser Lösung erfolgt durch Zugabe von 40 µl Na-Acetat pH 5,2 und 1 ml eiskaltem Ethanol. Nach vollständiger Fällung wird die chromosomale DNA mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA kann in ddH₂O aufgenommen werden und bei 4°C gelagert werden.

| | | |
|--------------------|--------------------|-----------|
| <u>SET-Puffer:</u> | 5 M NaCl | 1,5 ml |
| | 0,5 M EDTA | 5 ml |
| | 1 M Tris pH 7,5 | 2 ml |
| | ddH ₂ O | ad 100 ml |

3.2.3 Phenol/Chloroformextraktion

Eine Phenol/Chloroform-Behandlung dient zur Reinigung nukleinsäurehaltiger Lösungen von kontaminierenden Proteinen. Die Nukleinsäure-Lösung wird mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und durch Vortexen gemischt. Um eine gute Phasentrennung zu gewährleisten, wird der Ansatz für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die Nukleinsäuren und kann vorsichtig abgenommen werden.

3.2.4 Ethanolpräzipitation

Um Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung zu fällen, wird diese mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetatlösung pH 5,2 versetzt. Das Salz unterstützt die Zerstörung der Hydrathülle der Nukleinsäuren und erleichtert somit die Fällung. Die Präzipitation erfolgt entweder über Nacht bei -20°C oder für eine Stunde in flüssigem Stickstoff. Durch eine 15-minütige Zentrifugation sedimentiert das DNA-Präzipitat. Nach Entfernen des Überstandes wird zur Reinigung von überschüssigem Salz mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wird kurz getrocknet und in ddH₂O aufgenommen.

3.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des DNA- oder RNA-Gehaltes einer Lösung wird die Absorption eines verdünnten Aliquots in einer Quarzglasküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer gemessen.

| | |
|------------------------------------|----------------------------|
| 1 A ₂₆₀ entspricht etwa | 50 µg/ml dsDNA |
| | 40 µg/ml ssDNA oder RNA |
| | 20 µg/ml ss Oligonukleotid |

Im Photometer lässt sich weiterhin auch der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Probe bestimmen. Hierzu wird die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Durch das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ kann der Reinheitsgrad abgeschätzt werden. Saubere DNA-Lösungen weisen hier ein Verhältnis von 1,8 auf. Durch Kontamination mit Proteinen wird dieser Wert entsprechend kleiner.

3.2.6 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose- oder PAA-Gel wird das QIAEX II Gelextraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Die zu isolierenden DNA-Fragmente werden durch UV-Licht in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dieser Vorgang sollte nicht zu lange dauern, da die UV-Bestrahlung zur Schädigung der DNA führen kann. Das ausgeschnittene Gelstück wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgt anschließend nach dem Protokoll der Firma Qiagen.

3.2.7 Herstellung von einzelsträngiger *Carrier*-DNA zur Hefetransformation

Die Zugabe von *Carrier*-DNA bei der Hefetransformation ist für eine möglichst hohe Transformations-Effizienz von Nöten. Diese DNA sollte einzelsträngig, und die eingesetzten DNA-Fragmente sollten möglichst groß sein. Für die hier verwendete Methode wird 1 g Lachssperma-DNA eingesetzt. Diese wird mit TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml versetzt. Um die DNA zu lösen, wird der Ansatz über Nacht bei 4°C gerührt. Am darauffolgenden Tag erfolgt die Sonifizierung der DNA. Jeder Sonifizierungsschritt sollte nicht länger als 30 s bei 75 % Intensität sein. Nach der Ultraschallbehandlung wird ein Aliquot der Reaktion auf einem Agarosegel analysiert. Die optimale Verteilung der Fragmente liegt zwischen 2 kb und 15 kb. Die DNA-Lösung wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend durch Zugabe von Natrium-Acetat und Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wird in TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml resuspendiert. Nach Kochen der Probe für 2-3 min wird der Ansatz in Eiswasser gekühlt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.3.1 DNA-Restriktionsspaltung

Zur spezifischen Spaltung von DNA werden Restriktionsendonukleasen der Klasse II verwendet. Diese dienen *in vivo* der Bakterienzelle zum Schutz vor Fremd-DNA. Die Fremd-DNA, die zum Beispiel durch Phagen eingebracht wurde, wird durch Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Zelleigene DNA wird durch Modifikationen, meist Methylierung, geschützt. Zusammen mit Methylasen bilden Restriktionsendonukleasen sogenannte Restriktions-Modifikations-Systeme.

Restriktionsenzyme werden in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Manche Enzyme brauchen für ihre volle Aktivität noch den Zusatz von BSA (Bovines Serum Albumin). Die Inkubation der Reaktion erfolgt bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) für mehrere Stunden oder über Nacht. DNA-Fragmente mit endständigen Schnittstellen werden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Herabsetzung der Brown'schen Molekularbewegung zu bewirken. Im Reaktionsansatz sollte der Enzymanteil 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in glycerolhaltigem Puffer aufbewahrt werden. Eine zu hohe Glycerolkonzentration im Reaktionsansatz kann die Reaktion nachteilig beeinflussen. Ein typischer Restriktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

| | |
|---------------------|----------|
| DNA | 2 µg |
| 10x Reaktionspuffer | 1 µl |
| 10x BSA | 1 µl |
| Restriktionsenzym | 4 U |
| ddH ₂ O | ad 10 µl |

Nach der Restriktion können die Restriktionsendonukleasen durch Hitze inaktiviert oder mit Hilfe einer Ethanolpräzipitation aus dem Ansatz entfernt werden.

3.3.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppe einer Nukleinsäure wird die *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) verwendet. Diese Methode verwendet man, um zu vermeiden, dass durch Restriktionsendonukleasen gespaltene Vektor-DNA durch intramolekulare Religation wieder verbunden wird. Für die Dephosphorylierung ergibt sich folgender Ansatz:

| | |
|--------------------------|----------|
| DNA | 5 µg |
| 10x SAP-Reaktions-Puffer | 3 µl |
| SAP | 1 U |
| ddH ₂ O | ad 30 µl |

Der Ansatz wird für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend kann die SAP durch Erhitzen auf 65°C für 20 min inaktiviert werden. Diese DNA kann direkt in die nachfolgende Ligation eingesetzt werden oder vorher durch eine Ethanol-Präzipitation konzentriert werden.

3.3.3 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung von überhängenden komplementären oder glatten doppelsträngigen DNA-Fragmenten verwendet man die T4-DNA-Ligase. Zwischen den freien 3'-OH- und 5'-PO₄-Gruppen der Molekülen werden Esterbindungen geknüpft. In dieser Reaktion können DNA-Fragmente in Vektorplasmide eingeführt und kovalent verbunden werden. Vektor-DNA sollte für die Ligation in dephosphoryliertem Zustand vorliegen, die *insert*-DNA hingegen muss an ihren Enden Phosphatgruppen aufweisen. Zur Phosphorylierung von DNA kann das Enzym T4-Polynucleotid-Kinase (PNK) eingesetzt werden. Für die Ligation sollte das molare Verhältnis von Vektor und *insert* etwa 1:5 betragen. Die Mole an Enden linearer DNA können mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Mol Enden} = 2 \times \text{DNA-Masse in g} : ((\text{Anzahl der bp}) \times (649 \text{ Da/bp}))$$

Ein Standard-Ligationsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|--------------------|--|
| T4-DNA-Ligase | 1 U |
| Ligasepuffer (10x) | 2 µl |
| Vektor-DNA | 100 ng |
| <i>insert</i> | 3-5-facher molarer Überschuss (pmol Enden) |
| ddH ₂ O | ad 20 µl |

Die Ligation erfolgt bei 15°C über Nacht oder für 4 h bei Raumtemperatur. Die Ligase kann durch eine Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert werden. Anschließend wird der Ligationsansatz durch Ethanolpräzipitation von überschüssigem Salz gereinigt und kann dann in die Elektrotransformation eingesetzt werden.

3.3.4 Radioaktive Markierung eines PCR-Produkts

Um ein durch PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziertes DNA-Fragment radioaktiv zu markieren, verwendet man das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase (PNK). Diese überträgt die γ -Phosphatgruppe von γ - ^{32}P -ATP auf das 5'-Ende der DNA. PCR-Produkte, die mit Hilfe der Taq-Polymerase hergestellt wurden, tragen am Ende einen für die Polymerase typischen A-Überhang, der den Zugang für die PNK verschlechtert. Deshalb müssen solche DNA-Fragmente vor der Markierung für 10 min auf 70°C erhitzt werden, um die Enden der DNA aufzuschmelzen. Anschließend ist das 5'-Ende der DNA für die PNK frei zugänglich. Ein Markierungsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|---|---------------------|
| DNA | 200 ng |
| 10x PNK-Puffer | 1 μl |
| PNK | 1 μl |
| γ - ^{32}P -ATP(10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) | 3 μl |
| ddH ₂ O | ad 20 μl |

Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37°C.

3.3.5 Aufreinigung eines radioaktiv markierten PCR-Produkts

Zur Aufreinigung radioaktiv markierter Proben werden ProbeQuantTM G-50 Micro-Säulen der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Das PCR-Produkt wird hierbei von nicht inkorporierten Nukleotiden befreit. Der Ansatz aus der Markierungsreaktion wird mit 40 μl STE-Puffer versetzt. Die Mikrosäule wird kurz gevortext um das Säulenmaterial zu resuspendieren. Durch Zentrifugation für 1 min bei 2500 g wird die Äquilibrations-Flüssigkeit aus der Säule entfernt. Anschließend gibt man den gesamten Markierungsansatz auf das Säulenmaterial und zentrifugiert erneut für 2 min bei 2500 g. Die freien Nukleotide binden an das Säulenmaterial, die markierte DNA befindet sich im Durchsatz und wird in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Das markierte Fragment liegt in einem Endvolumen von etwa 50 μl vor.

3.4 Biochemische und physikalische Methoden

3.4.1 Gelelektrophorese

3.4.1.1 Agarosegele zur DNA-Analyse

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA werden 0,8 bis 3,5 %-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wird in 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose gelöst hat. Anschließend wird die verdampfte Flüssigkeitsmenge durch ddH₂O ersetzt. Das erstarrte Gel kann dann zur Elektrophorese verwendet werden. Der Gellauf erfolgt in 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer bei 50 bis 100 mA. Nach der Elektrophorese kann das Gel mit Ethidiumbromid ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) gefärbt werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Moleküle und kann durch UV-Licht bei 254 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die DNA wird so sichtbar gemacht.

3.4.1.2 SDS-Polyacrylamidgele

Denaturierende SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen sind aus einem Sammel- und einem Trenngel aufgebaut. In dieser Arbeit wurden 10 bis 15 %-ige Polyacrylamidgele verwendet.

15 %-iges Trenngel

| | | |
|-------|----|---|
| 15 | ml | 30 %-ige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung |
| 7,5 | ml | 1.5 M Tris-HCl pH 8,8 |
| 6,9 | ml | ddH ₂ O |
| 0,3 | ml | 10 % SDS |
| 0,3 | ml | 10 % APS |
| 0,012 | ml | TEMED |

Nach dem Gießen wird das Gel mit Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberkante zu erhalten. Nach der Polymerisierung wird das Ethanol abgegossen und die verbleibende Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgenommen. Anschließend kann das Sammelgel gegossen werden.

4,9%-iges Sammelgel

| | | |
|-------|----|--|
| 1,3 | ml | 30%-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung |
| 1,0 | ml | 1 M Tris-HCl pH 6,8 |
| 5,5 | ml | ddH ₂ O |
| 0,08 | ml | 10 % SDS |
| 0,08 | ml | 10 % APS |
| 0,008 | ml | TEMED |

Man lässt das Sammelgel für etwa eine Stunde auspolymerisieren. Die Proben für die Gelelektrophorese werden mit Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen für etwa 5 min bei 100°C gekocht. Imidazolhaltige Proben aus der Ni-NTA-Chromatographie werden für 15 min bei 37°C erwärmt. Bei höheren Temperaturen kann Imidazol die Fragmentierung der Proteine katalysieren. Der Gellauf erfolgt nun bei 180 V für etwa 3 h oder über Nacht bei 12 mA mit Lämmli-Puffer als Laufpuffer.

Laufpuffer für SDS-PAGE (Lämmli-Puffer)

| | | |
|-------------------------------|----|-------------------|
| 3 | g | Tris |
| 14,4 | g | Glycin |
| 10 | ml | 10 %-ige SDS-Lsg. |
| ddH ₂ O ad 1 Liter | | |

Nach dem Gellauf können die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht oder durch *Elektroblotten* auf eine Membran überführt werden.

3.4.1.3 Polyacrylamidgele zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente

Die hier beschriebene Methode dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp sind.

5,6 %-iges PAA-Gel:

| | | |
|------|----|---|
| 1,9 | ml | 30 %-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung |
| 1,0 | ml | 10x TBE |
| 7,0 | ml | ddH ₂ O |
| 0,1 | ml | 10 % APS |
| 0,01 | ml | TEMED |

Die Proben werden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgt bei 120 V für etwa 45 min in 1 x TBE-Puffer. Anschließend wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.4.1.4 Native Polyacrylamidgele für Gelretardations-assays

Für Gelretardations-*assays* werden native Polyacrylamidgele verwendet.

4,6 %-iges PAA-Gel:

| | | |
|-------|----|---|
| 4,6 | ml | 30 %-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung |
| 28 | ml | ddH ₂ O |
| 0,85 | ml | 10x TBE |
| 0,35 | ml | 10 % APS |
| 0,035 | ml | TEMED |

Nach der Polymerisierung erfolgt der Gellauf bei Raumtemperatur in 0,25x TBE. Für die ersten 30 min läuft das Gel bei 80 V, danach wird die Spannung auf 100 V erhöht. Nach 2,5 h ist die Elektrophorese beendet.

3.4.1.5 Polyacrylamidgele für 2D-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach der isoelektrischen Fokussierung wurden 10 %-ige Acrylamidgele nach Schägger und von Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) verwendet. Dieses Gel besteht lediglich aus einem Trenngelbereich, ein Sammelgel ist nicht notwendig.

10 %-iges PAA-Gel nach Schägger und Jaggow

| | | |
|-------|----|-----------------------------|
| 6,1 | ml | Acrylamid (49,5 % T, 3 % C) |
| 10 | ml | Gelpuffer |
| 4 | g | Glycerin |
| ad 30 | ml | ddH ₂ O |

Nachdem die Substanzen gut gemischt sind, werden 150 µl 10 %-iges APS und 15 µl TEMED zur Polymerisierung zugegeben. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten bis etwa 1 cm unter dem oberen Rand gegossen und mit ddH₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das ddH₂O abgenommen und die IPG-*strips* mit den in der ersten Dimension fokussierten Proteinen werden aufgebracht. Nach dem Auflegen wird der Streifen mit 0,5 %-iger Agarose in Kathodenpuffer überschichtet, um ein Verrutschen des Streifens während der nachfolgenden Elektrophorese zu vermeiden. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht bei 60 bis 80 V über Nacht. Nach mehreren Stunden Elektrophorese muss eventuell der Anodenpuffer ausgetauscht werden, um eine lokale Pufferveränderung auszugleichen.

| | | |
|-------------------------------------|--------------|---------|
| <u>Acrylamid (49,5 % T, 3 % C):</u> | Acrylamid | 480 g/l |
| | Bisacrylamid | 15 g/l |

Nach dem Lösen wird 1 Esslöffel Resin AG® 501-X8 zugegeben und für eine Stunde weitergerührt. Die Lösung wird anschließend durch einen Faltenfilter filtriert.

| | | |
|-------------------|---------|------|
| <u>Gelpuffer:</u> | 3 M | Tris |
| | 0,3 % | SDS |
| | pH 8,45 | |

| | | |
|----------------------|--------|------|
| <u>Anodenpuffer:</u> | 0,2 M | Tris |
| | pH 8,9 | |

| | | |
|------------------------|---------|---------|
| <u>Kathodenpuffer:</u> | 0,1 M | Tris |
| | 0,1 M | Tricine |
| | 0,1 % | SDS |
| | pH 8,25 | |

3.4.1.6 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Diese Färbemethode beruht auf der Reaktion von Silbernitrat mit Proteinen in saurer Lösung. Anschließend erfolgt die Reduktion der Silberionen durch Formaldehyd unter alkalischen Bedingungen zu metallischem Silber. Nach allgemeiner Auffassung dienen die freien Amine und Schwefelgruppen der Proteine als reaktive Gruppen. Mit dieser Methode lassen sich auch Nukleinsäuren anfärben.

| | | | |
|------------------|------|----|--------------------|
| <u>Fixierer:</u> | 50 | % | Methanol |
| | 12 | % | Essigsäure |
| | 500 | µl | Formaldehyd |
| | ad 1 | l | ddH ₂ O |

| | | | |
|-------------------------------|-----|---|--|
| <u>Lösung I (für 500 ml):</u> | 0,1 | g | Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O |
|-------------------------------|-----|---|--|

| | | | |
|--------------------------------|-------|----|-------------------|
| <u>Lösung II (für 250 ml):</u> | 0,5 | g | AgNO ₃ |
| | 187,5 | µl | Formaldehyd |

| | | | |
|---------------------------------|-----|----|---------------------------------|
| <u>Lösung III (für 250 ml):</u> | 15 | g | Na ₂ CO ₃ |
| | 125 | µl | Formaldehyd |
| | 5 | ml | Lösung I |

Weiterhin werden Ethanol (50 % v/v) und Essigsäure benötigt.

Zuerst wird das Gel für mindestens eine Stunde in Fixierer geschüttelt. Danach wird das Gel dreimal für 20 min mit 50 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird es für

1 min in Lösung I inkubiert und danach dreimal für 20 s mit ddH₂O gewaschen. Dann erfolgt eine 20-minütige Inkubation in Lösung II. Auch danach wird dreimal für 20 s mit ddH₂O gewaschen. Nun wird durch Zugabe von Lösung III bis zur gewünschten Bandenintensität entwickelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Essigsäure abgestoppt. Anschließend kann das Gel getrocknet oder nach Spülen mit ddH₂O aufbewahrt werden.

3.4.2 Nachweis radioaktiver Reaktionsprodukte

3.4.2.1 Autoradiographie

Nach Auftrennung in einer Elektrophorese können radioaktive Substanzen durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. Hiermit ist es möglich, Position und Intensität der Strahlung festzustellen. Die radioaktive Strahlung führt zu einer Schwärzung des Röntgenfilms an der entsprechenden Stelle. Die Exposition erfolgt in lichtdichten Filmkassetten bei Raumtemperatur oder bei Verwendung sogenannter *intensifying screens*, in der Filmkassette, bei -70°C.

3.4.2.2 Phospho Imaging

Anstelle von Röntgenfilmen können zum Nachweis radioaktiver Strahlung auch Spezialplatten, sogenannte „*imaging screens*“, verwendet werden. Diese tragen eine etwa 700 µm dicke BaFBrEu-Schicht und können radioaktive Strahlungsenergie in Form von (an Kristallgitterfehlstellen haftenden) Elektronen speichern. Dieses Material ist für Phosphor ³²P etwa 250 mal empfindlicher als ein Röntgenfilm. Zur Auswertung der *screens* wird ein *imager*-Auslesegerät mit einem HeNe-Laser (Rotlicht bei 600 nm) verwendet. Um benutzte Platten zu löschen, können diese mit gelbem Licht bestrahlt und beliebig oft wiederverwendet werden. Nachteilig bei dieser Methode ist die gegenüber dem Röntgenfilm schlechtere Auflösung.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung bei Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde die Methode nach Bradford verwendet. Zunächst wird eine Eichgerade mit Lösungen definierten Proteingehaltes erstellt. Für die Eichgeraden wird BSA als Eichprotein eingesetzt.

Zusammensetzung des Ansatzes:

| |
|--|
| 800 µl Proteinlg. + ddH ₂ O |
| 200 µl Bradford-Reagenz |
| 1000 µl Gesamtvolumen |

Die Ansätze werden gut gemischt. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Absorption im Photometer bei 595 nm. Aus dem Verhältnis der Absorption der von der Konzentration bekannten Eichlösung zur Absorption der untersuchten Proteinlösung kann die Konzentration der Probe ermittelt werden. Durch Parallelbestimmung der einzelnen Messwerte wird deren Genauigkeit erhöht.

3.4.4 Phosphorylierung von Proteinen

Es gibt eine Reihe von *response* Regulatoren, die mit Hilfe von Acetylphosphat eine Autophosphorylierungsreaktion durchführen können. Bei dieser Methode werden etwa 8 µg GST-NtrX in die Phosphorylierung eingesetzt. Der Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| <u>Phosphorylierungsreaktion:</u> | 5x Phosphorylierungspuffer | 4 µl |
| | Acetyl-PO ₄ (100 mM) | 1 µl |
| | MgCl ₂ (25 mM) | 3 µl |
| | GST-NtrX | 8 µg |
| | ddH ₂ O | ad 20 µl |

Die Proben werden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend kann das phosphorylierte Protein für weitere Experimente eingesetzt werden.

| | | |
|------------------------------------|-------------------|--------|
| <u>5x Phosphorylierungspuffer:</u> | Tris-HCl pH 7,5 | 250 mM |
| | KCl | 500 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |

3.4.5 Dephosphorylierung von Proteinen

Das Enzym alkalische Phosphatase ist in der Lage Phosphatgruppen von DNA oder von Proteinen zu entfernen. Es kann zur Dephosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP) mit GST-NtrX in eine Dephosphorylierungsreaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | | |
|-------------------------------------|-------------------------|----------|
| <u>Dephosphorylierungsreaktion:</u> | 10x SAP-Reaktionspuffer | 2 µl |
| | GST-NtrX | 8 µg |
| | SAP | 1 µl |
| | ddH ₂ O | ad 20 µl |

Der Ansatz wird für eine Stunde oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Das so dephosphorylierte Protein kann nun für weitergehende Experimente verwendet werden.

3.4.6 Western Analyse von Proteinen (*Westernblot*)

Mit dieser Methode können Proteine durch eine Reaktion mit einem Antikörper sichtbar gemacht werden. Die Proteine werden in einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wird dann mit einem ersten Antikörper behandelt, der hochspezifisch das gesuchte Protein bindet. In der anschließenden Reaktion wird nun ein zweiter Antikörper zugegeben, der den ersten Antikörper erkennt. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym (hier alkalische Phosphatase) gekoppelt, das nach Zugabe des entsprechenden Substrates eine Farbreaktion katalysiert.

Die proteinhaltigen Proben werden auf einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wird das Sammelgel abgetrennt. Ein Membranstück und 12 Stücke Whatmanpapier werden der Gelgröße entsprechend zurechtgeschnitten. Der Transfer der Proteine erfolgt mittels *Semi-Trocken-blot* in einer *blot*-Apparatur der Firma Amersham-Pharmacia. Sechs mit Transferpuffer befeuchtete Stücke Whatmanpapier werden in der *blot*-Apparatur exakt übereinander angeordnet. Darauf wird die angefeuchtete Membran gelegt, es folgen das Gel und wiederum sechs Lagen in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier. Der Transfer erfolgt durch eine angelegte Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche. Anschließend wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 4°C in *Blocking*-Lösung inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe des ersten Antikörpers. Dieser wird 1 : 200 in *Blocking*-Lösung verdünnt. Nach etwa 2 h wird die Membran dreimal für 10 min mit TTBS gewaschen. Der zweite Antikörper wird 1 : 15.000 in TTBS verdünnt und ebenfalls für etwa 2 h mit der Membran inkubiert. Nach weiteren drei 10-minütigen Waschsritten wird die Membran kurz in Substratlösung eingelegt und anschließend mit Substratlösung in einen Plastikbeutel überführt. Nach Zugabe von $4,5 \mu\text{l NBT /ml Substratlösung}$ und $3,5 \mu\text{l BZIP/ml Lösung}$ wird der Beutel verschweisst. Die Entwicklung erfolgt im Dunkeln. Wenn die gewünschte Bandenintensität erreicht ist, wird die Reaktion durch spülen mit ddH₂O und EDTA gestoppt.

| | | |
|-------------------------|------------------------|--------|
| <u>Transferpuffer:</u> | Methanol | 5 % |
| | Tris-HCl, pH 7,9 | 50 mM |
| | Glycin | 40 mM |
| | SDS | 0,04 % |
| <u>TTBS-Puffer:</u> | Tris-HCl, pH 7,5 | 50 mM |
| | NaCl | 200 mM |
| | Tween-20 | 1 % |
| <u>Blocking-Lösung:</u> | Milchpulver in TTBS | 5 % |
| <u>Substrat-Lösung:</u> | Tris-HCl, pH 9,5 | 100 mM |
| | NaCl | 100 mM |
| | MgCl ₂ | 50 mM |

3.4.7 *In vitro* Transkription/*in vitro* Translation

In dieser Arbeit wurde das *in vitro* T7-Transkriptions/Translations Kit der Firma Roche Molecular Biochemicals verwendet. Mit Hilfe dieses Systems werden DNA-Sequenzen transkribiert, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Die so erhaltene mRNA kann ohne weitere Aufreinigungsschritte mit Retikulycytenlysat in ³⁵S-Methionin markierte Proteine translatiert werden. Für die Transkriptions/Translationsreaktion werden 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Der Transkriptions-Ansatz sieht folgendermaßen aus:

| | |
|------------------------------|----------|
| 4 x T7-Transkriptions-Puffer | 5 µl |
| DNA (0,5 µg/µl) | 1 µl |
| ddH ₂ O | ad 20 µl |

Das Gemisch wird kurz zentrifugiert und anschließend für 15 min bei 30°C inkubiert. 10 µl der Transkription werden sofort in die Translationsreaktion eingesetzt.

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Transkriptions-Ansatz | 10 µl |
| ³⁵ S-Methionin (15 µCi/µl) | 1,6 µl |
| Retikulycytenlysat | 38,4 µl |

Der Ansatz wird kurz gemischt und zentrifugiert. Es folgt eine Inkubation für eine Stunde bei 30°C, danach wird die Reaktion auf Eis gestoppt. Das erhaltene radioaktiv markierte Protein kann anschließend für GST-*pull-down-assays* eingesetzt werden.

3.4.8 Zellaufschlussmethoden

3.4.8.1 Aufschluss bakterieller Zellen zur Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Das untenstehende Protokoll beschreibt einen nativen Zellaufschluss. Um Aktivitätsverluste des aufzureinigenden Proteins zu vermeiden, werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. 2 g tiefgefrorene Zellen des induzierten *E. coli* Stammes M15 (pQEregA, pREP4) werden in 10 ml (5 Volumen) kaltem His-tag-Aufschlusspuffer resuspendiert. Anschließend werden PMSF in einer Endkonzentration von 0,1 M und Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben. Die Zellsuspension verbleibt für 30 min auf Eis und wird dann sechsmal für 30 sec mit 60 % Intensität sonifiziert. Zwischen den einzelnen Sonifikationsschritten erfolgen kurze Pausen, damit sich die Lösung nicht erwärmt. Zur Sedimentation der Zellbruchstücke schließt sich eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm und 4°C an. Der Überstand enthält die cytoplasmatischen Proteine, also auch RegA, und kann zur Bindung an Ni-NTA-Agarose weiterverwendet werden.

3.4.8.2 Aufschluss bakterieller Zellen zur Glutathion-Affinitätschromatographie

Die tiefgefrorenen Zellen von 1 l Kultur des Stammes *E. coli* BL21 (pGEX-NtrX) werden in 20 ml 1 x PBS pH 7,3 resuspendiert. Auch bei diesem Zellaufschluss erfolgen alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. bei 4°C. Die Zellsuspension wird sechsmal für 30 sec bei 60 % Intensität sonifiziert und anschließend mit 1 ml 20 %-igem Triton X-100 versetzt. Danach erfolgt eine 30-minütige Inkubation auf dem Taumelrollenmischer bei 4°C. Abschließend werden die Zellbruchstücke durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand enthält die cytoplasmatischen Proteine, also auch NtrX, und kann zur Bindung an Glutathion-Sepharose weiterverwendet werden.

3.4.9 Gelretardations-assay

Das Prinzip von Gelretardations-assays beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren in nativen Elektrophoresegelen schneller wandern als Protein-Nukleinsäure-Komplexe. Die Bande der Nukleinsäure ist nach Zugabe von Protein in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verlangsamt und läuft näher am Auftragsort der Proben im Gel. Man spricht deshalb auch von einem „shift“.

| | | |
|-------------------------|------------------------------------|---------------|
| <u>Reaktionsansatz:</u> | 10x Bindungspuffer | 2 μ l |
| | LSD (50 μ g/ml) | 1 μ l |
| | DNA-Substrat (30.000 cpm/ μ l) | 1 μ l |
| | Protein-Lösung | variabel |
| | ddH ₂ O | ad 20 μ l |

Die Ansätze werden für 35 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 2 μ l DNA-Probenpuffer zugesetzt und die Proben auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Gellauf erfolgt bei 80 V für 30 min, danach wird die Spannung auf 100 V erhöht und die Elektrophorese für weitere 2 h fortgesetzt. Wenn die untere Markerspür (Bromphenolblau) etwa 4 cm vom unteren Rand des Gels entfernt ist, wird die Auftrennung beendet. Das Gel wird auf ein zugeschnittenes Whatmanpapier übertragen und für 90 min bei 80°C getrocknet. Zur Detektion der Banden wird über Nacht ein *imaging screen* aufgelegt.

| | | |
|----------------------------|--------|-------------|
| <u>10x Bindungspuffer:</u> | 100 mM | Tris pH 7,5 |
| | 500 mM | NaCl |
| | 10 mM | DTT |
| | 10 mM | EDTA |
| | 50 % | Glycerin |

3.4.10 GST-pulldown-assay

Mit dieser Methode ist es möglich, *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Hierzu wird ein Protein mit GST-tag an Gluthation-Sepharose gebunden. Das zweite (hier radioaktiv markierte) Protein wird hinzugegeben und bindet im Falle einer Interaktion an das immobilisierte GST-Protein. Durch mehrfaches Waschen wird ungebundenes Protein entfernt. Anschließend wird der gesamte Ansatz in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Falls eine Interaktion der beiden Proteine stattgefunden hat, so ist es möglich, mit dem gebundenen GST-Protein das zweite Protein aus der Lösung herauszuziehen. Man spricht deshalb von einem GST-pulldown.

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im GST-pulldown-assay wird zuerst die Glutathion-Sepharose 4B dreimalig mit NETN-Puffer gewaschen. Anschließend wird der Puffer mit der Sepharose im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese 50 %-ige Sepharose-Suspension wird dann mit etwa 50 μ g gereinigtem und dialysiertem GST-NtrX versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. In dieser Zeit sollte das GST-NtrX an das Säulenmaterial binden. Anschließend wird der Ansatz drei mal mit je 1 ml NETN-Puffer gewaschen und bei 3000 rpm für 15 s zentrifugiert. Danach erfolgt die Zugabe von 200 μ l Blocking-Lösung und eine weitere Inkubation für

15 min bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird dann wiederum dreimal mit je 1 ml NETN-Puffer und danach drei mal mit 1 ml TWB-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Dann werden der Reaktion 5 µl des *in vitro* translatierten zweiten Proteins, in diesem Fall RegA oder RegA*, zugesetzt. Es folgt eine Inkubation von etwa einer Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Anschließend wird durch intensives Waschen, zuerst sechs mal mit je 1 ml NETNM und danach zwei mal mit je 1 ml TWB, das radioaktiv markierte RegA bzw. RegA* entfernt. Lediglich an GST-NtrX gebundenes Protein verbleibt im Ansatz. Nach erfolgtem Waschen wird die Glutathion-Sepharose in SDS-Probenpuffer aufgenommen und der gesamte Ansatz auf ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. An die Elektrophorese schließt sich eine Inkubation des Gels für 1 h in Fixierer und anschließend für 30 min in 1 M Na-Salicylat an. Diese Reaktion erhöht die Strahlungsintensität des ³⁵S-Methionins. Das Gel wird nach der Behandlung mit Na-Salicylat getrocknet und auf einen Röntgenfilm gelegt.

NETN-Puffer:

| | |
|------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 8,0 | 20 mM |
| NaCl | 200 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Nonidet P-40 | 0,5 % |
| DTT | 1 mM |

(DTT erst kurz vor Beginn des Experiments zusetzen)

NETNM-Puffer: NETN-Puffer + 0,5 % Milchpulver

TWB-Puffer:

| | |
|-------------------|--------|
| Hepes, pH 7,9 | 20 mM |
| NaCl | 60 mM |
| MgCl ₂ | 6 mM |
| Glycerin | 8,2 % |
| EDTA | 0,1 mM |
| DTT | 1 mM |

(DTT erst kurz vor Beginn des Experiments zusetzen)

Blocking-Lösung: 50 ml NETN + 10 g Milchpulver, über Nacht schütteln bei 4°C; 10 min 100°C kochen; zentrifugieren bei 6000 rpm für 10 min; 1 ml Aliquots bei -20°C lagern; kurz vor Beginn des Experiments noch einmal für 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren.

3.4.11 2D-Gelelektrophorese

Vorbereitung der Zellen:

Die *in vivo* mit ^{35}S -Methionin markierten *Rhodobacter* Zellen werden zweimal mit eiskaltem 80 %-igem Aceton gewaschen. Hierbei werden die Pigmente der Zellen entfernt. Nach der Acetonbehandlung werden die Zellen getrocknet und in 120 μl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend verbleiben die Ansätze für 10-30 min bei Raumtemperatur, um das Lysieren der Zellen zu erreichen. Die Zellbruchstücke werden für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, und der Überstand wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Diese proteinhaltige Lösung wird nun für eine Messung im Szintillationszähler verwendet. 10 μl werden in 1 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und gemessen. Für die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese werden 1×10^6 cpm eingesetzt.

| | | | |
|--------------------|-------|----|--------------------|
| <u>Lysepuffer:</u> | 5,4 | g | Harnstoff |
| | 0,2 | ml | Triton X-100 |
| | 200 | mg | DTT |
| | 14 | mg | PMSF |
| | ad 10 | ml | ddH ₂ O |

Der Lysepuffer kann bei -80°C eingefroren werden. Jedoch sollte er nach dem Auftauen nicht ein zweites Mal eingefroren werden.

Vorbereitung der IPG-Ready Strips:

Die Streifen für die 1. Dimension (IPG-Ready Strips pH 4-7) werden in getrocknetem Zustand geliefert und müssen vor Gebrauch rehydriert werden. Dafür lässt man sie über Nacht in einer Rehydrierungskassette in Rehydrierungslösung quellen. Am nächsten Tag werden die Streifen aus der Kassette genommen und kurz auf einem mit Wasser getränkten Whatmanpapier abgetupft, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs auf der Geloberfläche zu verhindern. Anschließend werden die Streifen in die Streifenwanne eingebracht und nach Herstellerangaben mittels gewässerter Elektrodenstreifen aus Saugpapier (Macherey + Nagel MN40) mit der Anode bzw. der Kathode leitend verbunden. Die Seite des Streifens, die den sauren pH besitzt, wird mit der Kathode verbunden. Dann erfolgt das Einsetzen der Probenapplikatoren. Die Applikatoren müssen exakt über dem Gelstreifen angebracht werden. Die Streifen werden danach mit Mineralöl (Dry-Strip Cover Fluid, Plus One) überschichtet. Die Kammern der Probenapplikatoren sollten möglichst dicht schließen und kein Öl enthalten.

Elektrophorese 1. Dimension:

Nachdem die Streifen in die Apparatur eingebracht sind, erfolgt die Vorfokussierung. Hierzu wird eine Spannung von 150 V für 30 min angelegt. Nach dieser Zeit können die Proteinproben zur isoelektrischen Fokussierung geladen werden. Die anschließende Elektrophorese verläuft nach folgendem Programm:

| | Zeit [h] | Spannung [V] | Stromstärke [mA] | Leistung [W] |
|------------------|----------|--------------|---------------------|--------------|
| Phase I | 0,01 | 500 | 1 | 5 |
| Phase II | 3 | 500 | 1 | 5 |
| Phase III | 5 | 3500 | 1 | 5 |
| Phase IV | 12,5 | 3500 | 1 | 5 |

Äquilibration der IPG Ready *Strips* und Vorbereitung für die 2. Dimension:

Nach der Elektrophorese werden die Streifen aus der Wanne genommen und zwischen zwei Plastikfolien fixiert. Dann erfolgt die Äquilibration der IPG Ready *Strips* für die zweite Dimension. Hierzu werden die Streifen für 15 min in Lösung 1 geschüttelt. Nachdem das Inkubationsgefäß gründlich mit Wasser ausgespült wurde, verbleiben die *Strips* für weitere 15 min in Lösung II.

| | | |
|-------------------------------------|-----------|----------------------|
| <u>Äquilibrierungs-Grundlösung:</u> | 10 ml | 0,5 M Tris-Cl pH 6,8 |
| | 36 g | Harnstoff |
| | 30 ml | Glycerin |
| | 1 g | SDS |
| | ad 100 ml | ddH ₂ O |

Lösung I: 250 mg DTT auf 50 ml Äquilibrierungs-Grundlösung

Lösung II: 2,25 g Iodacetamid auf 50 ml Äquilibrierungs-Grundlösung

Um ein Auskristallisieren des Harnstoffs zu vermeiden, werden die Streifen kurz auf einem feuchten Whatmanpapier abgetupft und dann auf die Oberkante eines Polyacrylamidgels nach Schagger und von Jagow (siehe Abschnitt 2.4.1.5) aufgebracht. Die Elektrophorese läuft über Nacht bei 60-80 V. Am darauffolgenden Tag können die Gele mit Silbernitrat gefärbt und anschließend getrocknet werden. Zur Detektion von *in*

vivo mit ^{35}S -Methionin markierten Proteinen kann ein Röntgenfilm oder ein *phosphor-imaging screen* aufgelegt werden.

3.5 Säulenchromatographische Methoden

3.5.1 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Vorbereitung des Säulenmaterials:

Zur Äquilibrierung des Säulenmaterials werden 6-8 ml Ni-NTA Agarose (Qiagen) in einer Säule mit etwa 10 Säulenvolumina His-*tag*-Aufschlusspuffer gewaschen. Dann wird die Ni-NTA Agarose in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführt. Der geklärte Überstand aus dem Zellaufschluss wird zur Agarose gegeben. Anschließend erfolgt die Bindung des rekombinanten Proteins an die Ni-NTA Agarose. Hierzu wird das Gemisch für 2 h bei 4°C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Danach wird die Ni-NTA-Agarose bei 4°C in eine Säule von 1,6 cm Durchmesser gegeben. Nach Absetzen des Materials ergibt sich eine Säulenhöhe von etwa 2,5 cm. Auf das Säulenmaterial wird anschließend eine hydrophobe Fritte gegeben. Diese soll das Trockenlaufen der Säule verhindern.

Chromatographie:

Für die Wasch- und Elutionsschritte wird eine GradiFrac® Chromatographieranlage der Firma Amersham-Pharmacia verwendet. Die vorbereitete Säule wird bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 20 mM Imidazol in Aufschlusspuffer gewaschen bis der angeschlossene UV-Schreiber keine signifikante Absorption mehr anzeigt. Die geringe Menge an Imidazol soll dazu beitragen, unspezifisch gebundenes Protein von der Säule zu lösen. An diesen Waschschrift schließt sich die Elution des rekombinanten Proteins an. Hierzu wird im Zeitraum von 90 min ein Gradient von 20-500 mM Imidazol in Sonifizierungspuffer über die Säule geleitet. Der Gradient wurde folgendermaßen programmiert:

| Zeit (min) | % konz. B | Flussrate (ml/min) | Fraktion (ml) |
|------------|-----------|--------------------|---------------|
| 0 | 0 | 0,5 | 1 |
| 85 | 100 | 0,5 | 1 |
| 100 | 100 | 0,5 | 1,5 |

Durch die Elution des Proteins kommt es zu einem Anstieg der UV-Absorption. Allerdings absorbiert auch Imidazol im UV-Bereich und kann somit eluierendes Protein vortäuschen. Die gesammelten Proteinfractionen werden bei 4°C gelagert.

3.5.2 Glutathion-Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der Glutathion-Affinitätschromatographie können in *E. coli* überexprimierte an Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelte Proteine hochspezifisch aufgereinigt werden. Die vorbereitete Zellsuspension wird mit der vorher mit PBS äquilibrierten Glutathion Sepharose 4B gemischt und für 2 h bei 4°C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Anschließend wird der Ansatz noch für weitere 30 min bei Raumtemperatur weitergerollt. Eine Säule von etwa 1,6 cm Durchmesser wird mit der Sepharose-Mischung bei Raumtemperatur befüllt und mit 10-20 Säulenvolumina PBS gewaschen. Dann erfolgt die Elution des GST-Proteins durch Zugabe von reduziertem Glutathion in Elutionspuffer. Es werden etwa 1,5 Säulenvolumina Elutionspuffer auf die Säule pipettiert. Man lässt den Elutionspuffer in die Säule einlaufen und verschließt sie für etwa 10 min. Nach dieser Zeit wird die Säule wieder geöffnet und man kann die gereinigten Proteinfractionen in Eppendorfgefäßen auffangen. Um das gesamte Protein zu eluieren, werden noch etwa 5 Säulenvolumina PBS-Puffer auf die Sepharose gegeben. Die Fractionen können bei 4 °C gelagert werden. Wenn das Protein für GST-*pulldown-assays* eingesetzt werden soll (siehe Abschnitt 2.4.10), erfolgt vorher eine Dialyse gegen Tris-Puffer, um das enthaltene reduzierte Glutathion zu entfernen. Das Säulenmaterial kann durch Waschen mit 10 Säulenvolumina eines Regenerierungspuffers wieder von reduziertem Glutathion befreit werden. Danach werden noch dreimalig 5 Volumina PBS über die Säule geleitet. Nach dieser Prozedur ist die Glutathion-Sepharose vollständig regeneriert und kann für eine weitere Proteinreinigung verwendet werden.

PBS:

| | | |
|--------|----|----------------------------------|
| 140 | mM | NaCl |
| 2,7 | mM | KCl |
| 10,1 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 1,8 | mM | KH ₂ HPO ₄ |
| pH 7,3 | | |

Regenerationspuffer: 3 M NaCl in PBS

| | | | |
|-----------------------|----|----|------------------|
| <u>Dialysepuffer:</u> | 10 | mM | Tris-HCl, pH 7,5 |
| | 50 | mM | NaCl |
| | 2 | mM | DTT |

3.5.3 Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie

An Sepharose immobilisiertes Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet selektiv Antikörper (in erster Linie IgG) vieler Spezies. Dies geschieht durch die Interaktion von Protein A mit dem Fc-Anteil des IgG-Moleküls. Mit dieser Art der Affinitätschromatographie können Antikörper aus Seren aufgereinigt werden.

Vorbereitung des Säulenmaterials:

1,5 g Protein A-Sepharose (CL-4B) wird in Puffer A zum Quellen inkubiert. Anschließend wird die Sepharose in eine Säule mit einem Innendurchmesser von etwa 1,6 cm gefüllt und mit Puffer A äquilibriert. Die Flussrate beträgt hierbei etwa 0,7 bis 0,8 ml/min. Für die Wasch- und Elutionsschritte wird eine GradiFrac®-Anlage der Firma Amersham-Pharmacia eingesetzt.

Chromatographie:

Etwa 7 ml des Serums werden auf die Säule geladen. Dann wird mit Puffer A bis zur UV-Basislinie gewaschen. Danach erfolgt die Elution des Antikörpers mit Puffer B. Fraktionen von 30 Tropfen werden in je 250 µl 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 aufgefangen. Hierbei beträgt die Flussrate 0,7 ml/min. Die Fraktionen, die im Bereich des UV-Peaks eluierten, werden vereinigt und über Nacht (etwa 12 h) gegen Puffer A im Kühlraum dialysiert. Anschließend werden die Antikörperfraktionen im *Westernblot* auf ihre Aktivität untersucht.

3.6 Molekularbiologische Methoden


3.6.1 PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können selbst kleinste Mengen an DNA stark vervielfältigt werden. Als Enzym dient z. B. die hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. In einer ersten Reaktion wird das DNA-*template* durch Hitze denaturiert. Es schließt sich die *annealing*-Phase an, in der die *primer* an die DNA binden können. Anschließend erfolgt die DNA-Synthesephase, in der die Taq-Polymerase von den *primern* aus die DNA-Stränge vervollständigt. Die

Reaktionen werden meist etwa 30x durchlaufen. Ein typischer PCR-Ansatz von 50 µl setzt sich folgendermaßen zusammen:

| | | |
|--------------------|------------|----------|
| 10x Taq-Puffer | | 5 µl |
| 5x Q-Solution | | 10 µl |
| dNTPs | (2,5 mM) | 5 µl |
| 5'-primer | (50 pmol) | 2 µl |
| 3'-primer | (50 pmol) | 2 µl |
| DNA-template | (50 ng/µl) | 4 µl |
| Taq-Polymerase | (1 U/µl) | 1 µl |
| ddH ₂ O | | ad 50 µl |

Dient Plasmid-DNA als *template*, so werden nur etwa 10 ng DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wird mit 40 µl Mineralöl überschichtet, um einen Flüssigkeitsverlust durch die hohen Temperaturen zu vermeiden. Die Ansätze werden in einem *thermocycler* der Firma Biometra inkubiert. Die Programmierung sieht standardmäßig etwa so aus:

| | | | |
|------|-------|--|------|
| 98°C | 8 min |  | 30 x |
| 96°C | 1 min | | |
| 50°C | 1 min | | |
| 72°C | 2 min | | |
| 72°C | 3 min | | |

Die Dauer der einzelnen Phasen und die Temperaturen sind jeweils abhängig von DNA-*template* und *primern*.

3.6.2 *In situ* PCR

Für die Analyse von Plasmiden aus *S. cerevisiae* kann auch die *in situ* PCR eingesetzt werden. Hierbei werden Hefezellen in die PCR-Reaktion gegeben. Durch anfängliches Kochen für 2-8 min werden die Hefen lysiert, und die Plasmid DNA wird frei. Eine sehr kleine Menge an Zellen wird in folgendem PCR-Ansatz inkubiert.

| | |
|--------------------|----------|
| 10x Vent-Puffer | 2,5 µl |
| dNTPs (4 mM) | 1,5 µl |
| Primer A (50 pmol) | 2,0 µl |
| Primer B (50 pmol) | 2,0 µl |
| Vent-Polymerase | 1,0 µl |
| ddH ₂ O | ad 25 µl |

Die Ansätze werden mit 40 µl Mineralöl überschichtet und mit folgendem PCR-Programm inkubiert:

| | | | |
|------|-------|---|------|
| 96°C | 2 min | } | 30 x |
| 96°C | 1 min | | |
| 45°C | 2 min | | |
| 72°C | 1 min | | |
| 72°C | 3 min | | |

3.6.3 DNA-Sequenzierung

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Sequenzierungen wurden mit dem Kapillarsequenzierungsgerät *Genetic Analyzer 310* der Firma Applied Biosystems (ABI) durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten Di-Desoxynukleotiden. Diese führen in einer PCR-Reaktion zum Kettenabbruch. Am Ende einer jeden solchen Kette befindet sich dann ein markiertes Nukleotid. Die vier ddNTPs tragen jeweils eine unterschiedliche Fluoreszenz als Anhang. Diese kann während der Kapillarelektrophorese von einem Laser detektiert werden. Anhand der Größe der einzelnen PCR-Fragmente und deren Fluoreszenz kann die Sequenz der Probe ermittelt werden.

3.6.4 Southern Analyse von DNA

Die *Southern* Analyse dient dazu, bestimmte Abschnitte innerhalb der chromosomalen DNA durch Hybridisierung mit markierten Sonden sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die nichtradioaktive Methode verwendet, bei der die Markierung der Sonde durch den Einbau Digoxigenin(DIG)-gekoppelter Nukleotide erfolgt. Die Sonden wurden in einer Standard-PCR-Reaktion unter Zugabe von 1 µl DIG-Markierungs-Mix (Roche) oder durch eine Klenow-Auffüllreaktion markiert. Bei der Auffüllreaktion wird die denaturierte DNA mit Hexanukleotid-Gemisch (Roche) inkubiert. Die Hexanukleotide binden an die DNA und durch Zugabe von Klenow-Fragment, Nukleotiden und DIG-Markierungsmix (Roche) werden die einzelsträngigen DNA-Abschnitte zu Doppelsträngen ergänzt.

Ansatz für die Klenow-Markierungsreaktion:

| | |
|----------------------|----------|
| DNA | 5 µg |
| Hexanukleotidgemisch | 3 µl |
| dNTP-Mix (2,5 mM) | 3 µl |
| Klenow | 3 µl |
| ddH ₂ O | ad 30 µl |

Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA wird mit Ethanol gefällt, gewaschen und in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Die Markierungseffizienz wird im Vergleich mit markierter Kontroll-DNA verschiedener Verdünnungen durchgeführt. Für die Southern Analyse werden jeweils 10 µg chromosomale DNA von *R. capsulatus* mit 20 U eines Restriktionsenzym, hier *Hind*III, über Nacht gespalten. Am darauffolgenden Tag werden die Ansätze auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und bei etwa 40 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert. Es ist wichtig, die Abstände der Banden des Längenmarkers von den Taschen des Gels zu messen, um später eine Aussage über die Größe der detektierten DNA-Fragmente machen zu können. Das Gel wird dann zur Denaturierung der chromosomalen DNA zuerst für 30 min in Depurinierungspuffer, dann für 30-60 min in Denaturierungspuffer und abschließend für 30-60 min in Neutralisierungspuffer geschüttelt. Danach erfolgt der Transfer der DNA auf eine positive Membran (Appligene) mittels Kapillar-*blot* über Nacht. Am nächsten Tag wird die DNA durch UV-Bestrahlung mit der Membran verbunden. Diese Reaktion wird als UV-*crosslink* bezeichnet. Danach erfolgt die Prähybridisierung der Membran mit Prähybridisierungslösung für eine Stunde bei 68°C. Die Membran wird anschließend über Nacht mit der Hybridisierungslösung bei 68°C geschüttelt. Um überschüssige Sonde zu entfernen, wird am nächsten Tag dreimal für 20 min mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 68°C gewaschen. Danach erfolgt die Detektion bei Raumtemperatur. Hierzu wird die Membran für 30 min in Maleinsäurepuffer geschüttelt. Durch einstündige Inkubation in *Blocking*-Puffer wird ein unspezifisches Binden des Antikörpers in der darauffolgenden Reaktion verhindert. Nach dieser Stunde wird die Membran für eine weitere Stunde mit Antikörperlösung inkubiert. Der verwendete Antikörper bindet spezifisch an Digoxigenin. Endständig trägt er eine gekoppelte alkalische Phosphatase. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wird die Membran viermal für 15 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen und danach 5 min in Substratpuffer geschüttelt. Zur Detektion der alkalischen Phosphatase wird die Membran für 5 min in 10 ml Entwicklungslösung, die ein Chemolumineszenzsubstrat enthält, eingeschweißt. Danach wird die Entwicklungslösung entfernt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert. In dieser Zeit kann die alkalische Phosphatase das Substrat umsetzen. Anschließend können die Signale durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

| | | |
|----------------------------------|---|--------|
| <u>Depurinierungspuffer :</u> | HCl | 0,25 N |
| <u>Denaturierungspuffer:</u> | NaOH | 0,5 M |
| | NaCl | 1,5 M |
| <u>Neutralisierungspuffer:</u> | Tris-HCl, pH 7,5 | 1,5 M |
| | NaCl | 1,5 M |
| <u>Prähybridisierungspuffer:</u> | Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2 | 250 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| | SDS | 20 % |

Unmittelbar vor der Prähybridisierung werden dem Prähybridisierungspuffer noch 0,5 % *Blocking*-Reagenz zugesetzt (1 ml einer 10 %-igen Lösung auf 20 ml Prähybridisierungspuffer).

| | | |
|-------------------------------|--|--------|
| <u>Hybridisierungspuffer:</u> | Prähybridisierungspuffer | 20 ml |
| | <i>Blocking</i> -Reagenz | 0,5 % |
| | Sonde (25 ng/ml Hybridisierungslösung) | 0,5 µg |

| | | |
|---------------------|----------------------------------|-------|
| <u>Waschpuffer:</u> | Na ₂ HPO ₄ | 20 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| | SDS | 1 % |

| | | |
|---------------------------|----------------------------|--------|
| <u>Maleinsäurepuffer:</u> | Maleinsäure | 100 mM |
| | NaCl | 3 M |
| | Tween-20 | 0,3 % |
| | pH 8,0 mit NaOH einstellen | |

Maleinsäure löst sich nur bei einem pH-Wert von über 8,0. Deshalb werden dieser Lösung bereits anfänglich 7 g NaOH pro Liter zugesetzt. Wenn der pH-Wert durch Lösen der Maleinsäure wieder unter pH 8 fällt, muss erneut NaOH zugegeben werden.

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| <u><i>Blocking</i>-Puffer:</u> | Maleinsäurepuffer |
| | 0,5 % <i>Blocking</i> -Reagenz |

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| <u>Antikörperlösung:</u> | <i>Blocking</i> -Puffer |
| | Anti-DIG-Antikörper (1:15000) |

| | | |
|------------------------|------------------|--------|
| <u>Substratpuffer:</u> | Tris-HCl, pH 9,5 | 100 mM |
| | NaCl | 100 mM |

| | | |
|----------------------------|--|--------|
| <u>Entwicklungslösung:</u> | Substratpuffer | |
| | Chemolumineszenzsubstrat CDPStar TM | 625 µM |

3.6.5 Qualitativer Filter β -Galaktosidase-assay bei *S. cerevisiae*

Hefeklone, die im 2-Hybridsystem auf SD-Platten ohne Adenin, Leucin, Tryptophan und Histidin gewachsen sind, werden mit dieser Methode auf eine Expression des *lacZ*-Gens untersucht. Hierzu werden die Hefen auf vorher beschriftete und autoklavierte Whatman-Filterpapiere ausgestrichen, die auf SD-Platten ohne LT liegen. Auf jedem Filter werden 14 Hefeklone zusammen mit zwei Kontrollklonen ausgestrichen. Als Positivkontrolle dienen Hefen, die mit den Plasmiden pGAD-T7-T und pGBK-T7-53 transformiert sind. Diese Hefen exprimieren das SV40 T-Antigen als Aktivator-domänen-Fusion und das p53 Protein als DNA-Bindedomänen-Fusion. Da beide Proteine eine starke Interaktion zeigen, exprimieren diese Hefen unter anderem das Reportergen *lacZ* für die β -Galaktosidase. Als Negativkontrolle dienen Hefen, die keinerlei Expression des *lacZ* Gens zeigen. Die auf SD-Platten ohne LT ausgestrichenen Hefen werden für 2-3-Tage bei 30°C inkubiert. Am Tag des Experiments wird für jeden bewachsenen Filter eine Petrischale vorbereitet. Hierin befindet sich ein zweiter Whatmanfilter, der mit 4 ml Z-Puffer/X-GAL-Lösung angefeuchtet ist. Die bewachsenen Filter werden von den Platten abgezogen und in flüssigem Stickstoff für 10 s eingefroren. Nachdem die Filter bei Raumtemperatur aufgetaut sind, werden sie, mit der bewachsenen Seite nach oben, in die vorbereitete Petrischale gelegt und für 2 bis 24 h bei 30°C inkubiert. Durch Anwesenheit der β -Galaktosidase wird das im Z-Puffer enthaltene X-GAL (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -Galaktopyranosid) umgesetzt und es entsteht das blaugefärbte 5-Brom-4-chlor-indigo.

| | | | |
|--|---|-------|--|
| <u>Z-Puffer:</u> (pH 7,0) | Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O | 16,1 | g/l |
| | NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 5,5 | g/l |
| | KCl | 0,75 | g/l |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,246 | g/l |
| <u>X-GAL Lösung:</u> D-Galaktopyranosid | 20 | mg/ml | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β - in N,N-Dimethylformamid |
| <u>Z-Puffer/X-GAL Lösung:</u> | 100 | ml | Z-Puffer |
| | 0,27 | ml | β -Mercaptoethanol |
| | 1,67 | ml | X-GAL-Lösung |

3.6.6 Quantitativer β -Galaktosidase-assay bei *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Kulturen werden über Nacht in 5 ml SD-Medium ohne LT angezogen. Am darauffolgenden Tag werden 2 ml der Kultur in 8 ml YPAD-Medium überführt und für 3-5 h bei 30°C weitergeschüttelt. Während dieser Zeit werden 4 mg/ml Ortho-Nitrophenyl- β -Galaktosid (ONPG) durch Rühren für 1-2 Stunden bei 4°C in Z-Puffer gelöst. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 erreicht haben, werden sie durch Vortexen für 1 min durchmischt und noch einmal die genaue OD₆₀₀ bestimmt. 1,5 ml der Kultur werden mit 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wird mit 1,5 ml Z-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in 300 μ l Z-Puffer aufgenommen. 100 μ l der Zellsuspension werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgt bei 37°C im Wasserbad. Als Leerwerte für die anschließende photometrische Messung werden zwei zusätzliche Reaktionsgefäße mit je 100 μ l Z-Puffer bereitgestellt. In den Ansatz mit Zellsuspension und in die beiden Leerkontrollen werden jeweils 700 μ l Z-Puffer + β -Mercaptoethanol gegeben. Durch Zugabe von 0,16 ml ONPG-Lösung wird die Reaktion gestartet. Der Startzeitpunkt muss exakt festgehalten werden, um später eine Kalkulation der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit erstellen zu können. Die Reaktionsgefäße werden bei 30°C inkubiert, bis sich eine Gelbfärbung entwickelt. Als Positivkontrolle dient ein Hefestamm, der die beiden Proteine p53 und das SV40 T-Antigen koexprimiert. Diese Probe färbt sich innerhalb von etwa ein bis zwei Stunden. Bei schwächeren Interaktionen kann die Reaktion bis zu 24 h dauern. Um die Enzymaktivität zu beenden werden den Ansätzen je 0,4 ml 1 M Na₂CO₃ zugesetzt. Danach erfolgt eine Zentrifugation mit 13000 rpm für 10 min um Zellbruchstücke abzutrennen. Der Überstand wird in Photometer-Küvetten überführt und die Absorption bei 420 nm bestimmt. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase berechnet sich in Miller-Einheiten (Miller, 1972). Eine Einheit β -Galaktosidase ist definiert als die Menge, die pro Minute 1 μ mol ONPG zu *ortho*-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysiert. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Einheiten} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{(t \times V \times \text{OD}_{600})}$$

wobei gilt: t = Inkubationszeit in Minuten
 V = Eingesetztes Kulturvolumen in ml

3.6.7 β -Galaktosidase-assay bei *E. coli* und *R. capsulatus*

Zur Untersuchung der β -Galaktosidase-Aktivität von *E. coli* oder *R. capsulatus* werden die entsprechenden Kulturen unter den gewünschten Bedingungen angezogen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wird die OD₆₀₀ bzw. OD₆₆₀ der Kultur bestimmt. Je nach erwarteter Enzymaktivität werden Volumina von 0,1-1 ml der Kultur entnommen und durch Zentrifugation bei 8000 rpm sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 900 μ l Z-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 2 Tropfen Chloroform und einem Tropfen 0,1 %-iger SDS-Lösung wird der Ansatz für 30 s gevortext. Die Proben werden für 5 min bei 28°C vorgewärmt. Um die Reaktion zu starten, werden jedem Ansatz 200 μ l ONPG-Lösung (4 mg/ml) zugesetzt. Der Startzeitpunkt wird genau festgehalten. Nach Einsetzen der Gelbfärbung oder nach einem bestimmten Zeitintervall werden die Reaktionen durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Die Proben werden für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Zellbruchstücke abzutrennen. Der Überstand wird in eine Photometer-Küvette überführt und die Absorption bei 420 nm und 550 nm bestimmt. Die Enzymaktivität berechnet sich wie folgt:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Einheiten} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1,82 \times \text{OD}_{550})}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

wobei gilt: t = Inkubationszeit in Minuten
 V = Eingesetztes Kulturvolumen in ml

4 ERGEBNISSE

Das Zweikomponentensystem RegB/RegA ist an der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl unterschiedlichster Gene innerhalb der *R. capsulatus* Zelle beteiligt. Um eine spezifische Regulation der einzelnen Prozesse zu ermöglichen, bedarf es noch einer Reihe weiterer Regulatorproteine, die im Zusammenspiel mit dem *response* Regulator RegA die Transkription aktivieren bzw. reprimieren. RegA ist im Gegensatz zu den meisten *response* Regulatoren bereits in unphosphoryliertem Zustand in der Lage, an DNA zu binden. Die Aktivierung der Transkription von Zielgenen erfolgt dagegen nur, wenn RegA phosphoryliert vorliegt. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von RegA zu einer Konformationsänderung führt, die ihrerseits eine Wechselwirkung mit anderen Regulatorproteinen bzw. der Transkriptionsmaschinerie zur Folge hat. Durch die Interaktion der einzelnen Proteine könnte es dann zur Aktivierung der Transkription kommen. Zur Identifizierung solcher Interaktionspartner von RegA sollte in dieser Arbeit das Hefe 2-Hybridsystem eingesetzt werden.

4.1 Untersuchung von RegA und RegA* im 2-Hybridsystem

4.1.1 Theoretischer Überblick

Viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren setzen sich aus zwei funktionell unabhängigen Domänen zusammen. Solche Regulatoren enthalten häufig eine DNA-bindende Domäne (DNA-BD) und eine oder mehrere aktivierende Domänen (AD). Beide Domänen sind notwendig, um die Transkription eines Gens zu aktivieren. Ein solcher Regulator ist zum Beispiel das GAL4 Protein der Hefe *S. cerevisiae*. Werden beide Domänen physikalisch getrennt und in der gleichen Hefezelle koexprimiert, so können sie nicht miteinander interagieren und somit die Genexpression nicht aktivieren. Wenn die Domänen aber in unmittelbare Nähe gebracht werden, so funktionieren sie wie das ursprüngliche GAL4 Protein. Diese Tatsache macht man sich beim Hefe 2-Hybridsystem zunutze. Hierbei wird eines der zu untersuchenden Proteine mit der GAL4-Bindedomäne, das andere mit der Aktivator-domäne fusioniert. Anschließend werden beide Fusionsproteine in einer Hefezelle koexprimiert. Kommt es zur Interaktion der beiden Proteine, so entsteht räumliche Nähe zwischen GAL4-Binde- und GAL4-Aktivator-Domäne, und die Genexpression von Zielgenen kann aktiviert werden. Im Falle des hier genutzten 2-Hybridsystems werden als Reportergene Gene für Histidin-Synthese, Adenin-Synthese und das *lacZ* Gen für die β -Galaktosidase

eingesetzt. Um eine mögliche Interaktion zweier Proteine zu testen, können die Hefezellen auf Medien ohne die entsprechenden Aminosäuren angezogen werden. Wachstum auf diesen Medien deutet auf eine Interaktion der untersuchten Proteine hin. In dieser Arbeit sollten Proteine identifiziert werden, die eine Wechselwirkung mit RegA zeigen. Deshalb sollte eine Genbank von *R. capsulatus* SB1003 angelegt und die einzelnen Genbank-Fragmente mit der GAL4-Aktivator-domäne fusioniert werden. RegA sollte als Köderprotein mit der GAL4-Bindedomäne fusioniert werden. Im Falle einer Interaktion der beiden in der Hefe koexprimierten Proteine, kommt es zur Expression der GAL4-abhängigen Reportergene. Die so identifizierten Hefeklone können dann für weitere Untersuchungen genutzt werden. Der Aufbau des Hefe 2-Hybridsystems ist beispielhaft in Abbildung 4.1 dargestellt.

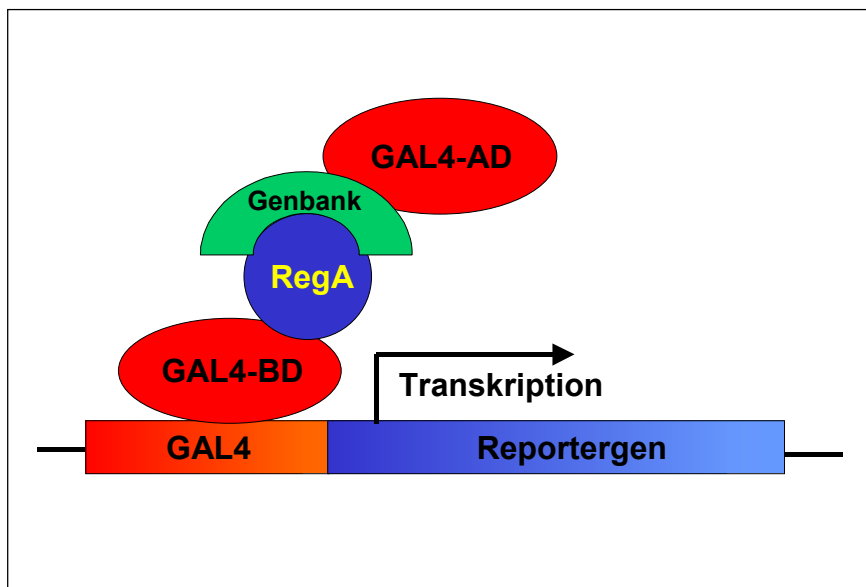


Abb. 4.1: Das Hefe 2-Hybridsystem: Das Köderprotein, hier RegA, ist mit der GAL4-Bindedomäne (GAL4-BD) fusioniert, das Genbankprotein (Genbank) mit der GAL4-Aktivator-domäne (GAL4-AD). Bei Interaktion der beiden Proteine kommt es zu einer unmittelbaren Nähe der beiden GAL4-Proteine. Diese führt zur Expression der stromabwärts der GAL4-Bindestelle liegenden Gene.

4.1.2 Untersuchung der Interaktion von RegA und RegA* mit RegB im Hefe 2-Hybridsystem

Zuerst sollte die bereits bekannte Interaktion von RegA und RegB im Hefe 2-Hybridsystem untersucht werden. Hiermit sollte festgestellt werden, ob das System prinzipiell geeignet ist, um Interaktionen von RegA zu untersuchen. Hierzu wurden RegA und RegB sowohl mit der GAL4-Bindedomäne als auch mit der GAL4-

Aktivator-domäne fusioniert. Das *regA* Gen wurde mittels der Endonuklease *EcoRI* aus dem Plasmid pAS*regA* ausgeschnitten und in die Hefeexpressionsplasmide pGAD-T7 und pGBK-T7 kloniert. Im Falle von RegB sollte lediglich die cytoplasmatische Domäne des Proteins in der Hefezelle exprimiert werden, da die Membrananker-Domäne im 2-Hybridsystem störende Wirkungen haben könnte. Der entsprechende Teil des *regB* Gens wurde mit *EcoRI* aus pAS*regB* geschnitten und in die Hefeexpressionsvektoren kloniert. Die jeweiligen Fusionsproteine wurden in *S. cerevisiae* AH109 koexprimiert und die Hefen auf Selektionsplatten SD ohne Leucin/Tryptophan/Histidin inkubiert. Trotz mehrfacher Versuche war es nicht möglich, Wachstum der *S. cerevisiae* Zellen auf diesen Platten festzustellen. Es konnte also keine Interaktion von RegA und RegB im Hefe 2-Hybridsystem nachgewiesen werden.

Es ist möglich, dass für die Interaktion innerhalb des Zweikomponentensystems RegB/RegA eines der beiden Proteine phosphoryliert vorliegen muss. Findet *in vivo* eine Interaktion der Proteine statt, so liegt entweder die Sensorkinase in phosphoryliertem Zustand vor und überträgt den Phosphatrest auf den *response* Regulator, oder RegA ist phosphoryliert und wird von RegB dephosphoryliert. Deshalb sollte für weitere Untersuchungen die konstitutiv aktive Form RegA* eingesetzt werden. Dieses Protein befindet sich durch einen Aminosäureaustausch konstant in einer Konformation, die der phosphorylierten Form des Proteins ähnelt (Du *et al.*, 1998). Das *regA** Gen wurde ebenso in die beiden Hefe-Expressionsvektoren pGAD-T7 und pGBK-T7 kloniert. Hierzu wurde ein 1500 bp Fragment, das das *regA** Gen trug, aus dem Plasmid pETCBD*regA** mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* ausgeschnitten und in den Vektor pGAD-T7 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde in eine PCR mit den beiden *primern* pGAD-HA und *regA-end* eingesetzt und ein 550 bp Fragment amplifiziert, das ebenfalls das *regA** Gen enthielt. Dieses wurde dann nach Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* in pGAD-T7 und pGBK-T7 kloniert. pGAD-T7-*regA** wurde anschließend mit pGBK-*regB* in *S. cerevisiae* AH109 transformiert. Die so generierten Hefeklonen waren in der Lage, auf den Selektionsplatten ohne Histidin und Adenin zu wachsen. Die Zellen zeigten 33 % der β -Galaktosidase-Aktivität der internen Positivkontrolle (siehe Abbildung 4.2). Dieses Ergebnis belegt, dass die Interaktion von RegA* und RegB auch im Hefe 2-Hybridsystem nachweisbar ist. Für die beiden Plasmide pGBK-T7-*regA** und pGAD-T7-*regB*, also genau entgegengesetzt kloniert, konnte die Interaktion nicht bestätigt werden.

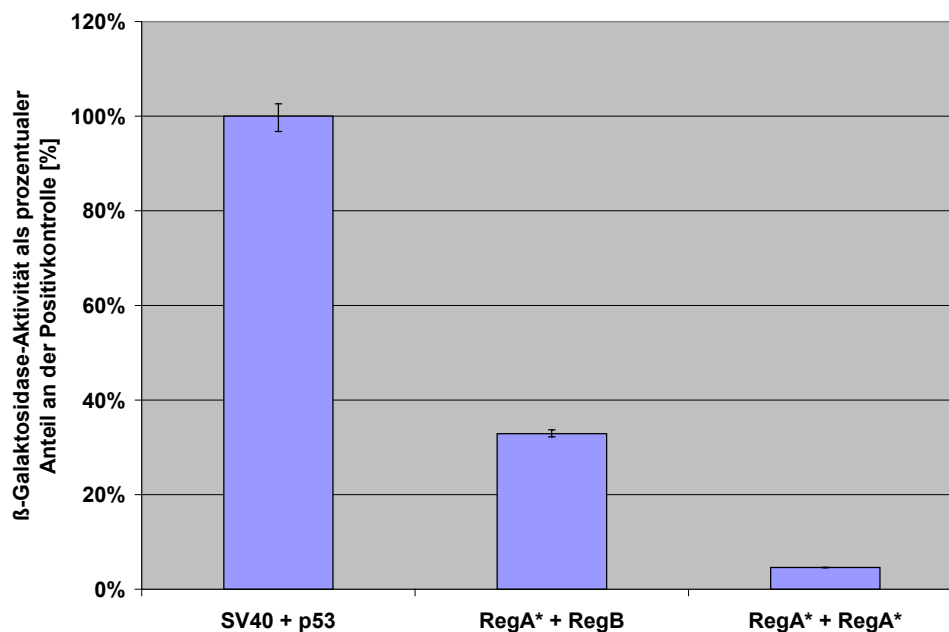


Abb. 4.2: Untersuchung der Interaktionsstärke von RegA*: Zellen, die das Plasmid pGAD-T7-*regA** und entweder pGBK-T7-*regB* oder pGBK-T7-*regA** tragen, wurden in einem quantitativen β -Galaktosidase-assay untersucht. Die Prozentangaben beziehen sich auf die interne Positiv-Kontrolle pGAD-T7-T und pGBK-T7-53. Die Interaktion von RegA* mit RegB zeigte etwa 33 % der β -Galaktosidase-Aktivität der Positivkontrolle. Wurden RegA* und RegA* koexprimiert, so konnten nur 7 % der Aktivität der Positivkontrolle gemessen werden. Die Messungen wurden insgesamt sechsmal durchgeführt und die Mittelwerte hier aufgetragen. Die jeweils größten Abweichungen vom Mittelwert sind durch Fehlerbalken angedeutet.

Der Kontroll-Stamm trägt die Plasmide pGAD-T7-T und pGBK-T7-53. Die in diesen Hefen exprimierten Fusionsproteine (GAL4-AD mit dem großen T-Antigen von SV40 und GAL4-BD mit p53) zeigen eine starke Interaktion. Neben den Studien mit RegB wurde RegA* auch auf eine mögliche Interaktion mit RegA und mit RegA* untersucht. Auch hier konnte eine schwache Interaktion von RegA* sowohl mit RegA (Daten nicht gezeigt), als auch mit der konstitutiv aktiven Form RegA* nachgewiesen werden. Diese Interaktion war allerdings mit nur 7 % der Positivkontrolle deutlich schwächer als die von RegA* und RegB (Abb. 4.2). Die hier gezeigten Ergebnisse zur β -Galaktosidase-Aktivität wurden insgesamt sechsmal pro Hefeklon durchgeführt und der in Abbildung 4.2 dargestellte Mittelwert errechnet.

4.1.3 Suche nach Proteinen, die mit RegA und RegA* im 2-Hybridsystem interagieren

Das Hefe 2-Hybridsystem sollte nun eingesetzt werden, um Proteine zu finden, die mit RegA oder mit RegA* interagieren. Hierzu wurde zu Beginn eine Genbank von

R. capsulatus SB1003 angelegt. Diese wurde anschließend mit RegA bzw. RegA* in *S. cerevisiae* AH109 koexprimiert. Die Zellen wurden verschiedenen Selektionsschritten unterzogen, um die Klone zu identifizieren, in denen eine Interaktion der beiden Fusionsproteine zu beobachten war.

4.1.3.1 Herstellung einer Genbank von *Rhodobacter capsulatus*

Für die Herstellung der Genbank wurde chromosomale DNA von *R. capsulatus* SB1003 isoliert. Zehn Ansätze mit je 100 µg chromosomaler DNA wurden parallel mit 10 U des Restriktionsenzym *Sau3AI* partiell geschnitten. *Sau3AI* hat eine Erkennungssequenz von 4 Basenpaaren und schneidet die DNA sehr häufig. Deshalb wurden die Ansätze nur für 8 min bei Raumtemperatur inkubiert, und das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Nach dieser Zeit wurde ein Aliquot auf einem Agarosegel überprüft. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von frischem Enzym so lange wiederholt, bis die Fragmentgröße bei etwa 500 bis 2000 bp lag. Dieses sollte gewährleisten, dass jedes Fragment möglichst nur für ein Gen oder den Teil eines Gens kodiert. Die Restriktionsansätze wurden anschließend auf einem präparativen 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Fragmente der entsprechenden Größe ausgeschnitten, und die DNA wurde aufgereinigt. Hierbei wurde die geschnittene DNA nach Größe in drei Gruppen aufgeteilt. Die Fragmente der Größe 2000 bis 1500 bp wurden zur Gruppe I zusammengeschlossen, die Fragmente von 1500 bp bis 900 bp bilden die Gruppe II und die kleinsten Fragmente die Gruppe III. Diese Strategie sollte gewährleisten, dass nicht nur kleine Fragmente, deren Ligation möglicherweise schneller vonstatten geht, in den Vektor ligiert werden.

Da *Sau3AI* Restriktionsenden produziert, die kompatibel mit den Enden sind, die durch die Restriktionsendonuklease *Bam*HI geschnitten wurden, konnten die Fragmente nun in den mit *Bam*HI linearisierten Vektor pGAD-T7 ligiert werden. Die Plasmide wurden anschließend durch Elektrottransformation in *E. coli* MC1061 gebracht. Insgesamt wurden 7×10^4 unabhängige Klone detektiert. Von 100 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, um festzustellen, ob alle Klone ein Fragment der richtigen Größe trugen. Das Ergebnis einer solchen Restriktion ist beispielhaft in Abbildung 4.3 gezeigt. Es ist erkennbar, dass Fragmentgrößen aller drei Bereiche vorhanden sind. Etwa 80 % der getesteten Klone enthielten ein Plasmid mit inseriertem Genbankfragment.

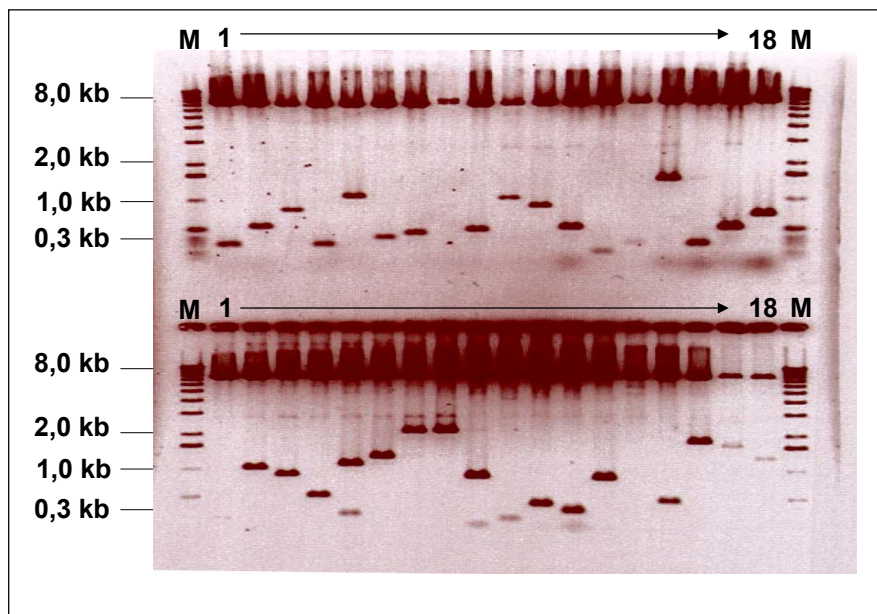


Abb. 4.3: Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsanalysen einzelner Klone aus der Genbank von *R. capsulatus*: Das Bild zeigt ein 1 %-iges Agarosegel. Aufgetrennt wurde die mit *Eco*RI und *Xho*I geschnittene Plasmid-DNA von 36 Genbank-Klonen. Bei 33 Klonen ist ein *insert* erkennbar, wobei die Größe der *inserts* zwischen 0,3 und 2 kb lag. Der Vektor hat eine Größe von 8 kb. M: DNA-Längenmarker

Weiterhin ließ sich feststellen, dass die meisten der charakterisierten Klone nur ein *insert* trugen. Die kleinsten gefundenen Fragmente hatten eine Größe von etwa 300 bp. Die erforderliche Anzahl an Klonen für eine repräsentative Genbank wurde nach Clarke und Carbon (1976) berechnet. Die Anzahl der Klone ergibt sich aus folgender Formel:

$$\frac{\ln(1-P)}{\ln(1-x/y)} = \text{Anzahl der Kolonien (N)}$$

P = Wahrscheinlichkeit für die Vollständigkeit der Genbank (0,99)

x = Minimale Fragmentgröße (300 bp)

y = Genomgröße von *Rhodobacter capsulatus* ($3,8 \times 10^6$ bp)

(Fonstein und Haselkorn, 1993)

Für eine repräsentative Genbank sind etwa $6,14 \times 10^4$ Kolonien erforderlich. Für die Herstellung der Genbank wurden 7×10^4 Klone verwendet. Die Repräsentativität sollte also gewährleistet sein. Die erhaltenen Klone wurden von den Selektionsplatten mit St.I- Medium abgeschwemmt und es wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt.

Gleichzeitig wurden Kulturen zur Plasmidisolierung angezogen. Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden große Mengen Plasmid-DNA benötigt. Deshalb wurden die *E. coli* Kulturen zur Plasmidisolierung in einem 10 l Fermenter angezogen. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und für die Transformation verwendet.

4.1.3.2 Suche nach Interaktionspartnern von RegA mit Hilfe des 2-Hybridsystems

Für die Transformation der Genbank wurden aus 3 l Kultur von *S. cerevisiae* AH109 kompetente Zellen hergestellt. Die Zellen wurden auf drei Ansätze aufgeteilt und mit 0,5 mg Genbank Plasmid-DNA und 1 mg pGBK-*regA* transformiert. Nach 5 Tagen wuchsen etwa 1125 Hefeklone auf den Selektionsplatten SD ohne Leucin/Tryptophan/Histidin. Diese wurden auf neue Selektionsplatten überführt, in denen zusätzlich zu den bereits genannten Aminosäuren auch Adenin fehlte. Auf diesen Platten konnten etwa 1031 der Hefeklone wachsen. Alle diese Klone wurden für die Untersuchungen zur β -Galaktosidase-Aktivität eingesetzt. 148 Klone zeigten eine blaue Kolonie-Färbung nach Inkubation mit X-GAL. Die so identifizierten Zellen wurden nun in einem weiteren Test auf die Spezifität ihrer Protein-Interaktion hin untersucht. Hierzu wurden alle Genbank-Plasmide aus den entsprechenden Hefeklonen isoliert und in *E. coli* XLI blue transformiert. Nach einer Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde diese erneut in *S. cerevisiae* AH109 transformiert. Gleichzeitig wurde jeweils eines der Plasmide pGBK-T7, pGBK-T7-*lam* und pGBK-T7-*regA* in *S. cerevisiae* Y187 transformiert. pGBK-T7 kodiert die GAL4-DNA-Bindedomäne, pGBK-T7-*lam* kodiert ein Fusionsprotein aus GAL4-DNA-Bindedomäne und Lamin C. Alle *S. cerevisiae* AH109-Klone mit Genbankplasmid wurden in einem *mating* jeweils mit den drei verschiedenen *S. cerevisiae* Y187-Stämmen gepaart. Nach der Paarung wurden die Zellen auf verschiedene Selektionsplatten ausplattiert. Liegt eine spezifische Interaktion vor, so sollten nur die Stämme Wachstum zeigen, in denen Genbank-Protein und pGBK-T7-*regA* gleichzeitig exprimiert werden. Zeigen aber auch Zellen Wachstum, in denen außer dem Genbankprotein nur die GAL4-Bindedomäne oder ein völlig anderes Protein (Lamin C) koexprimiert werden, wird die Interaktion als unspezifisch eingeschätzt. Diese Genbankproteine interagieren mit der GAL4-BD bzw. dem LaminC und zeigen keine spezifische Interaktion mit RegA. Nach dieser Untersuchung blieben noch 40 Hefestämme übrig, die eine spezifische Interaktion von RegA und dem Genbank-Protein zeigten. Die *inserts* der Genbank-Plasmide dieser Stämme wurden anschließend sequenziert und die erhaltenen Sequenzen in drei

verschiedenen Datenbanken auf Homologie zu bekannten Proteinen aus *R. capsulatus* untersucht. Als Datenbanken wurden die *Rhodobacter*-Datenbank WIT (<http://wit.mcs.anl.gov/WIT2>), die Datenbank des European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk>) und die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet. Es wurde jeweils mit den BLAST-Programmen *blastp*, *blastn* und *blastx* gearbeitet. Die Sequenzen wurden in FASTA-Format eingegeben.

4.1.3.2.1 Ergebnisse der 2-Hybridsystem-Analyse

Von den Proteinen, die im 2-Hybridsystem als mögliche Interaktionspartner von RegA identifiziert wurden, konnten 18 sofort von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Bei diesen Hefeklonen war das Genbankfragment im Plasmid in falscher Orientierung inseriert, das exprimierte Protein ist also völlig artifiziell. In Abbildung 4.4 wurden einige der identifizierten Proteine zusammengestellt, die eine Interaktion mit RegA im 2-Hybridsystem zeigten. Die hier dargestellten Proteine zeigten die höchste Homologie zu bereits sequenzierten Proteinen. Eine vollständige Übersicht über die identifizierten Interaktionspartner von RegA ist im Anhang 8.2 zu finden.

1. **Nitrogenase-Eisen-Molybdän-Cofactor Biosynthese Protein NifN RRC 0430**
2. **Nitrogenase-Eisen-Eisen-Protein α -Untereinheit AnfD RRC 2047**
3. **NtrX RRC 2425**
4. **RecA RRC 3447**
5. **Nuklease-Untereinheit des Excinuklease-Komplexes UvrC RRC 2955**
6. **Eisenreguliertes Protein FrpC RRC 1604**
7. **exportiertes Protein RRC 1919**
8. **unbekanntes Protein RRC1641**

Abb. 4.4: Ergebnisse der 2-Hybridsystem-Analyse mit RegA als Köderprotein: Die Abbildung zeigt einige der gefundenen Interaktionspartner von RegA. Die zur weiteren Untersuchung ausgewählten Proteine wurden farbig hervorgehoben. Angegeben wurde die putative oder experimentell nachgewiesene Funktion der identifizierten Proteine.

Das RegB/RegA-Zweikomponentensystem ist wie bereits erwähnt an der Regulation von Stickstoff-Fixierungsgenen in *R. capsulatus* beteiligt. Im Hefe 2-Hybridsystem wurden verschiedene Proteine als Interaktionspartner von RegA identifiziert, die ebenfalls an der Stickstoff-Fixierung oder deren Regulation beteiligt sind. Diese Proteine werden im Folgenden genauer beschrieben. Hierzu gehört die Nitrogenase-Untereinheit AnfD, die zweimal in unterschiedlichen Genbank-Plasmiden gefunden wurde. In beiden Plasmiden befand sich ein DNA-Fragment, das die Aminosäuren 77 bis 183 des AnfD Proteins kodierte (Abb. 4.7). Weiterhin wurde das NifN Protein identifiziert, das an der Synthese des Eisen-Molybdän-Cofaktors der Nitrogenase beteiligt ist. Im Falle von NifN wurden die Aminosäuren 82 bis 166 des Proteins als mit RegA interagierender Bereich identifiziert (Abb. 4.7). Einen möglichen Regulator der Stickstoff-Fixierungsgene stellt der putative *response* Regulator NtrX dar. Dieses Protein wurde ebenfalls in zwei unabhängigen Hefeklonen gefunden. In beiden Hefe-Expressionsplasmiden befand sich das gleiche DNA-Fragment von NtrX. Dieses Fragment kodiert die Aminosäuren 51 bis 95 des Proteins und beinhaltet damit die putative Phosphorylierungsstelle, das Aspartat an Position 52 (Abb. 4.8). Die Stärke der Interaktion zwischen RegA und den im 2-Hybridsystem gefundenen Proteinen AnfD, NifN und NtrX wurde in einem quantitativen β -Galaktosidase-Test ermittelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 4.5 und 4.6 dargestellt.

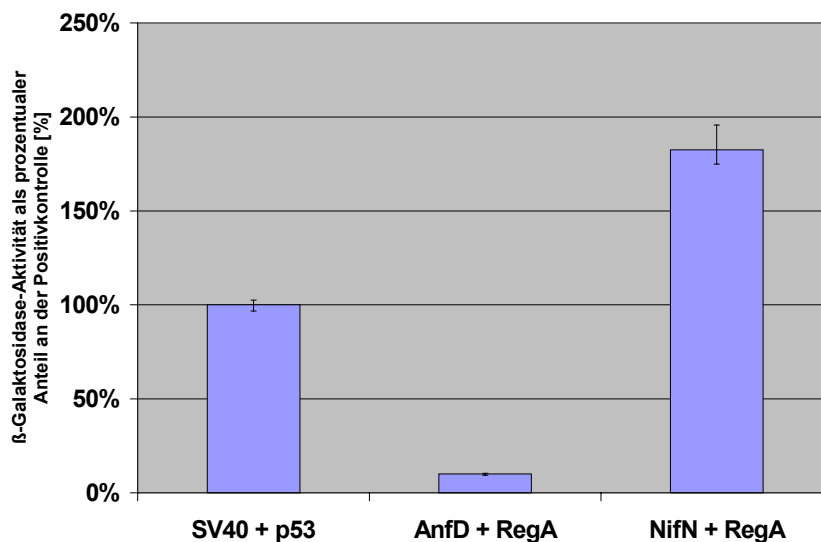


Abb. 4.5: β -Galaktosidase-Aktivität der Hefeklone, die RegA und AnfD bzw. NifN koexprimieren: Die Prozentangaben beziehen sich auf die interne Positivkontrolle SV40 + p53. Hefen, die sowohl AnfD als auch RegA exprimieren, zeigten eine β -Galaktosidase Aktivität von etwa 10 % der Positivkontrolle. Bei gleichzeitiger Expression von RegA und NifN wurden 182 % des Wertes der Positivkontrolle erreicht. Die gezeigten Daten wurden insgesamt sechsmal für jeden Hefeklon bestimmt. In dieser Abbildung sind die Mittelwerte dieser Messungen aufgetragen. Die jeweiligen maximalen Abweichungen vom Mittelwert wurden durch Fehlerbalken angedeutet.

Die jeweiligen Prozentangaben beziehen sich auf die Positiv-Kontrolle des 2-Hybridsystems. In dieser Hefe wurden das p53 Protein und das SV40 T-Antigen koexprimiert. Diese Proteine zeigen eine starke Interaktion, die im 2-Hybridsystem zur Kontrolle eingesetzt wird. Die β -Galaktosidase-Aktivität dieser Hefezellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Aktivität der Hefeklonen, die RegA und ein Genbankprotein enthalten, wurde auf die Positivkontrolle bezogen. Interessanterweise erwies sich die Interaktion von NifN und RegA mit 182 % der Positivkontrolle als sehr stark, sogar deutlich stärker als die Interaktion von RegA* und RegB. Trotz der Homologie von AnfD und NifN weist die β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen, die AnfD und RegA koexprimieren nur 10 % der internen Kontrolle auf.

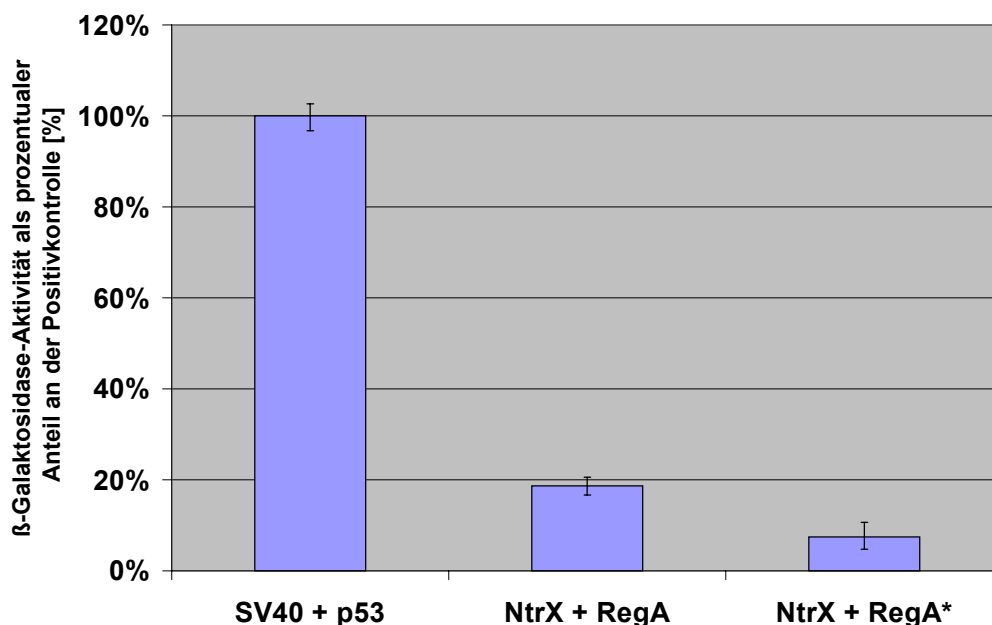


Abb. 4.6: β -Galaktosidase-Aktivität der Hefeklonen, die NtrX und RegA bzw. RegA* koexprimieren: Die Prozentangaben beziehen sich auf die interne Positivkontrolle SV40 + p53. Hefen, die NtrX und RegA zusammen exprimieren zeigten eine β -Galaktosidase-Aktivität von etwa 17 % der Positivkontrolle. Werden NtrX und RegA* koexprimiert, so lag der Wert bei etwa 7 % der Kontrolle. Die hier gezeigten Mittelwerte stammen aus sechs verschiedenen Experimenten pro Hefeklon. Die jeweils maximalen Abweichungen vom Mittelwert wurden durch Fehlerbalken angedeutet.

Die Interaktion von RegA und NtrX ist mit 17 % der Positivkontrolle etwa halb so stark wie die zwischen RegA* und RegB gefundene Wechselwirkung. Werden RegA* und NtrX in einer Hefezelle exprimiert, so ergibt sich eine β -Galaktosidase-Aktivität, die etwa 7 % der Stärke der Positivkontrolle erreicht.

1

AnfD: MPYHEFEVSKCIPERREHAVMKAAGEDLTSCLPKGYLNTIPGTISERGCA
 T + A
NifN: LSTNPLKTSA

1

AnfD: YCGAKHVIGTPMKDVIHISHGPNNGCTYDTWQTKR..YISDNDNFQLKYTF
 GA + ++ ++ + HG +GCT +
NifN: PLGAAMAYLG.IEGAVPLFHGAQGCTAFGVVHLVRHFKEAVP.....LQ

AnfD: ATDVKEKHVVFGAEGLLKKSMEAFDAFPNIKRM TVYQTCTTALIGDDVD
 T + E + G +++++ + T T G+D+
NifN: TTAMNEVSTILGGGEQIEEAIDNIRKRANPKFIG.IASTALTETRGEDIA

AnfD: AIAK...EVMEERGDVDVFVCNSPGFAGPSQSGGHHKIN..I.AWLNQKV
 ++ ++ V +P F G Q G K+ I A L
NifN: GELRAMQVRRKDWVGTAVVHVITPDFEG.GQQDGWAKAVEAIVAALVPVT

232

AnfD: GTVEPDYLGHEVINYVGEYNIQGD.QEVMIDYFNRMGIQVLSTFTG
 + + + ++ G+ +
NifN: ...AERDPDLRQVTLLVPSCFTTAEIDEAVRMIRAFGLSPIVLPDL

190

Abb. 4.7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von NifN und AnfD: Die in den Sequenzen grau hinterlegten Teile wurden im 2-Hybridsystem als mit RegA interagierende Bereiche der Proteine identifiziert. Das *alignement* der Sequenzen wurde nach Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) vorgenommen. Von beiden Aminosäuresequenzen wurde jeweils der N-terminale Bereich der Proteine dargestellt (AnfD: Aminosäuren 1 bis 232; NifN: Aminosäuren 1 bis 190). Die Homologie der beiden Proteine im gegenübergestellten Bereich liegt bei etwa 31 %. Insgesamt waren 14 % der dargestellten Aminosäuren der beiden Proteine identisch.

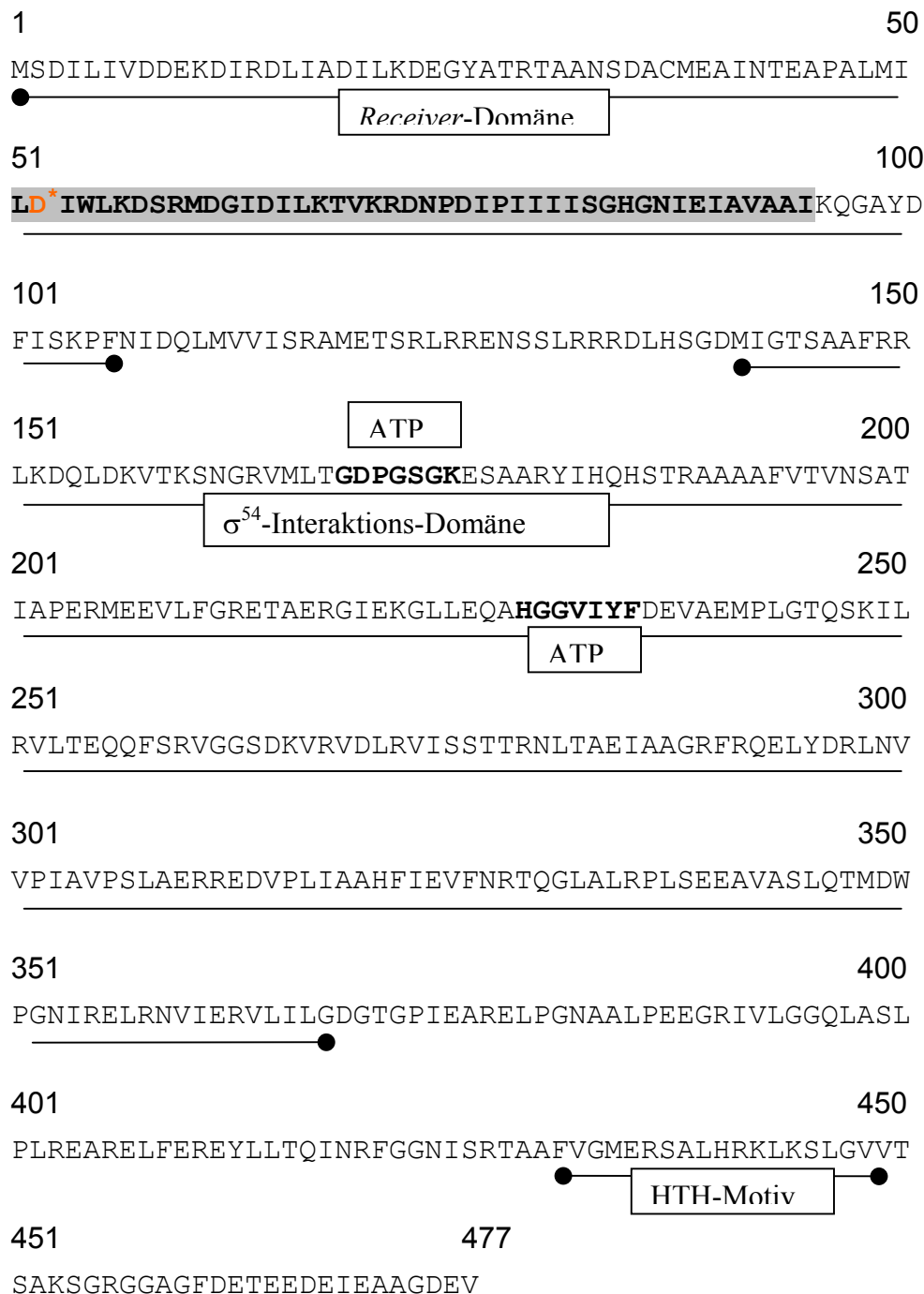


Abb. 4.8: Aminosäuresequenz des NtrX-Proteins: Der unterlegte Teil der Sequenz zeigt den im Hefeklon enthaltenen Bereich des Proteins. Durch Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen konnte einigen Bereichen eine putative Funktion zugeordnet werden. Die *Receiver*-Domäne erstreckt sich etwa von Position 1 bis 106 der Aminosäuresequenz. Das in der Abbildung rot markierte Aspartat an Position 52 stellt die putative Phosphorylierungsstelle des Proteins dar. Von Position 141 bis 367 erstreckt sich die potentielle Interaktionsdomäne mit dem Transkriptionsfaktor σ^{54} . Putative ATP-Bindungsstellen wurden zwischen Position 169 bis 176 und zwischen Position 229 und 238 gefunden. Anhand der Homologie konnte auch ein *helix-turn-helix* Motiv im Bereich der Aminosäuren 430 bis 449 identifiziert werden (nach WIT (<http://wit.mcs.anl.gov/WIT2>)).

Das gesamte *ntrX* Gen wurde anschließend durch PCR mit den *primern* *ntrX*-49 und *ntrX*-1729 von chromosomaler *R. capsulatus* SB1003 DNA amplifiziert. Das Gen wurde über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xho*I in das Hefe-Expressionsplasmid pGAD-T7 kloniert. Wurde dieses Plasmid pGAD-T7-*ntrX* zusammen mit pGBK-T7-*regA* in *S. cerevisiae* AH109 exprimiert, so konnte keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass nur der im Genbankplasmid enthaltene Teil von NtrX eine Wechselwirkung mit RegA zeigt und dieser Abschnitt möglicherweise in der Gesamtstruktur des Proteins nicht frei zugänglich ist.

4.1.3.3 Suche nach Interaktionspartnern von RegA* mit Hilfe des 2-Hybridsystems

Für die Suche nach Proteinen, die mit RegA*, der konstitutiv aktiven Form von RegA, im Hefe 2-Hybridsystem interagieren, wurden 3 l Kultur von *S. cerevisiae* AH109 zur Herstellung kompetenter Zellen angezogen. Die Zellen wurden mit je 500 µg Genbank-Plasmid-DNA und 1 mg pGBK-*regA** transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf Selektionsplatten SD ohne Leucin/Tryptophan/Histidin ausgestrichen. Nachdem Kolonien sichtbar wurden, wurden diese mit einem sterilen *Whatman*-Filterpapier auf eine SD-Platte ohne Leucin/Tryptophan/Histidin/Adenin überführt. Auf diesen Platten wuchsen nach einigen Tagen etwa 1200 Kolonien. In anschließenden Untersuchungen zur β -Galaktosidase Aktivität zeigten noch etwa 25 Kolonien eine blaue Färbung. Diese wurden in eine PCR mit den *primern* 5'-AD und 3'-AD eingesetzt. Hierbei wurde das im Plasmid integrierte Genbank-Fragment amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden aus einem 1 %-igen Agarosegel gereinigt und sequenziert.

4.1.3.3.1 Ergebnisse der 2-Hybridsystem-Analyse

Nur vier der Proteine, die als Interaktionspartner von RegA* identifiziert wurden, kamen für eine weitere Untersuchung in Frage, da in den übrigen Fällen durch *antisense* Orientierung des DNA-Fragments im Plasmid, ein artifizielles Protein entstanden ist. Diese möglichen Interaktionspartner von RegA* sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

1. **NtrY RRC 2426**
2. **Stickstoff-Fixierungs-Aktivatorprotein
(Synechocystis sp.) RRC 149**
3. **Hypothetisches Protein RRC 2756**
4. **Hypothetisches membranassoziiertes Protein
RRC 2443**

Abb. 4.9: Ergebnisse der 2-Hybridsystem-Analyse mit RegA* als Köderprotein: In dieser Abbildung sind die Proteine dargestellt, die im 2-Hybridsystem eine Interaktion mit RegA* zeigten. Angegeben wurde jeweils die putative Funktion der identifizierten Proteine. Da keines der Proteine eine spezifische Interaktion mit RegA* zeigte, wurde keine genauere Charakterisierung der jeweiligen Wechselwirkung vorgenommen.

Auch bei der 2-Hybridsystem-Analyse von RegA* wurden als interagierende Proteine solche identifiziert, die in die Stickstoff-Fixierung oder deren Regulation involviert sind. NtrY, die Sensorkinase des NtrY/NtrX Zweikomponentensystems, zeigte ebenso eine Interaktion mit RegA* wie das Stickstoff-Fixierungs-Aktivatorprotein RRC 149. Nach der Sequenzierung sollten die einzelnen Proteine nochmals auf ihre spezifische Interaktion mit RegA* untersucht werden. Hierzu wurde in einem *mating*-Experiment getestet, ob bereits eine Interaktion mit der GAL4-DNA-Bindedomäne allein oder einem unspezifischen Protein Lamin C existiert. Bei dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass beide an der Stickstoff-Fixierung beteiligten Proteine bereits eine selbstaktivierende Wirkung haben, also bereits mit der GAL4-DNA-Bindedomäne allein interagieren können. Im Falle von NtrY ist diese Wechselwirkung mit der Bindedomäne mit 14 % der Positivkontrolle sogar deutlich stärker als die von NtrY und RegA*. Die Interaktionsstärke von NtrY und RegA* lag bei weniger als 1 % der Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt).

4.2 Interaktion von RegA mit dem *response* Regulator NtrX

4.2.1 Charakterisierung von NtrX *in vivo*

Durch die Untersuchungen im Hefe 2-Hybridsystem wurde NtrX als potentiell mit RegA interagierendes Protein identifiziert. Da über die Funktion von NtrX aus *Rhodobacter* bisher keine Erkenntnisse vorlagen, sollte eine Deletion des *ntrX* Gens im Chromosom von *Rhodobacter capsulatus* und die anschließende Studie der so generierten Mutante Aufschluss darüber geben, welche Rolle das Protein in der Zelle spielt.

4.2.1.1 Deletion von *ntrX* bei *R. capsulatus*

Zuerst sollte mit Hilfe einer *Southern-Blot*-Analyse festgestellt werden, ob im Chromosom von *R. capsulatus* eine oder mehrere Kopien von *ntrX* vorhanden sind. Hierzu wurden 10 µg chromosomale DNA von *R. capsulatus* SB1003 mit je 20 U 16 verschiedener Restriktionsenzyme gespalten und auf einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran übertragen und diese Membran mit einer *ntrX*-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert.

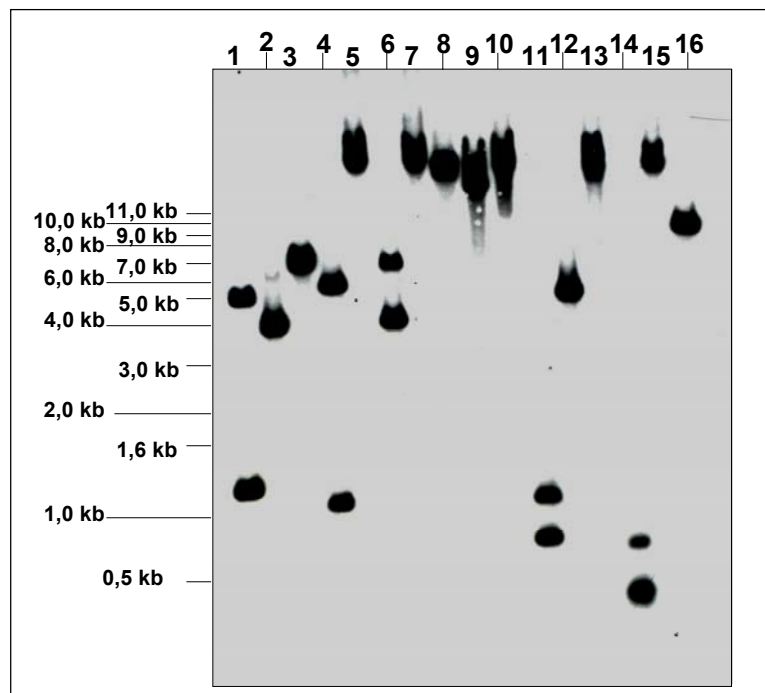


Abb. 4.10: *Southern-Blot* chromosomaler DNA aus *R. capsulatus* SB1003: Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines *Southern-Blots* von chromosomaler DNA aus *R. capsulatus* SB1003. Die DNA wurde mit 16 verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und die Membran anschließend mit einer *ntrX*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Restriktionsansätze wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: 1.) *EcoRI*, 2.) *HindIII*, 3.) *BamHI*, 4.) *PstI*, 5.) *XbaI*, 6.) *SalI*, 7.) *SacI*, 8.) *BglII*, 9.) *XhoI*, 10.) *KpnI*, 11.) *SmaI*, 12.) *ClaI*, 13.) *NotI*, 14.) *AvaI*, 15.) *ScaI*, 16.) *NcoI*

Die Fragmentgröße der erhaltenen Signale wurde ermittelt (Abb. 4.10). Anhand von bekannten Sequenzen aus der *Rhodobacter* Datenbank wurde die theoretische Größe der einzelnen Fragmente bestimmt und diese mit den experimentell erhaltenen Daten verglichen. Hieraus ergab sich, dass im Chromosom von *R. capsulatus* SB1003 nur eine Kopie des *ntrX* Gens vorliegt. Weiterhin wurde *Hind*III als geeignetes Enzym für die Analyse der NtrX-Deletionsmutanten identifiziert. *Hind*III schneidet nicht innerhalb des *ntrX* Gens. Die Größe des durch die Endonuklease *Hind*III generierten DNA-Fragments ist mit etwa 4 kb ideal zur weiteren Analyse im *Southern-Blot*, da man die Insertion einer Resistenzkassette von etwa 1,5 kb am Laufverhalten des Fragments im Agarosegel gut erkennen kann. Bei der vergleichenden Untersuchung der Fragmentgrößen anhand der Datenbank konnte ein Unterschied zwischen der Sequenz des untersuchten Stammes von *R. capsulatus* und dem sequenzierten Stamm der Datenbank identifiziert werden. Laut *Rhodobacter* Datenbank befindet sich keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sal*I innerhalb des *ntrX* Gens. Man kann allerdings nach Spaltung mit *Sal*I zwei Signale im *Southern-Blot* detektieren, was dafür spricht, dass sich eine solche Schnittstelle im *ntrX* Gen befindet. Dieser Unterschied der beiden Sequenzen kann durch einen Fehler bei der Sequenzierung innerhalb der Datenbank, oder durch spontane Mutation des hier verwendeten *R. capsulatus* Stammes entstanden sein.

Die NtrX-Deletions-Mutante sollte durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination in das *ntrX* Gen von *R. capsulatus* hergestellt werden. Hierzu wurden flankierende Bereiche des *ntrX* Gens mittels PCR aus chromosomaler DNA amplifiziert. Der stromaufwärts des *ntrX*-Gens liegende Bereich wurde mit den primern *ntrX*-77 und *ntrX*-743, der stromabwärts des Gens liegende Bereich mit den primern *ntrX*-1229 und *ntrX*-1749 amplifiziert. Die entstandenen DNA-Fragmente trugen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Kpn*I und *Bam*HI. Mit Hilfe der *Hind*III und der *Kpn*I Schnittstellen wurden die beiden Fragmente in den sogenannten Suizidvektor pPHU281 kloniert, der Tetrazyklinresistenz vermittelt. Dieses Plasmid kann in *Rhodobacter* nicht repliziert werden und kann deshalb zur Mutagenese eingesetzt werden. Über die *Bam*HI-Schnittstelle konnte anschließend zwischen den beiden *Rhodobacter*-DNA-Fragmenten eine Kanamycin-Resistenzkassette eingeführt werden. Das so erhaltene Plasmid pPHU281-*ntrX*::Km wurde in den *E. coli* Stamm S17-1 transformiert. S17-1 ist in der Lage, ein Plasmid zu mobilisieren und durch eine Konjugation nach *Rhodobacter* zu übertragen. Das Plasmid pPHU281-*ntrX*::Km wurde

von *E. coli* S17-1 nach *R. capsulatus* SB1003 konjugiert. Nach 4 Tagen waren etwa 1000 Kolonien auf den Platten gewachsen. 200 der Klone wurden auf Kanamycin- und Tetracyclin-haltigen Platte getestet, um festzustellen, ob es sich bei der homologen Rekombination um ein *single-crossover* oder ein *double-crossover* Ereignis handelte. Sollte der gesamte Vektor ins Chromosom integriert worden sein, so liegt ein *single-crossover* vor, da nur einer der flankierenden Bereiche zur homologen Rekombination beigetragen hat. Diese Mutanten tragen neben dem durch Resistenzkassette inaktivierten *ntrX* Gen noch das intakte Wildtypgen in ihrem Chromosom, da sie den gesamten Vektor integriert haben. Diese Zellen sind deshalb auch gut von den *double-crossover* Klonen zu unterscheiden, da auf dem Plasmid ein Gen für Tetracyclin-Resistenz liegt. Allerdings ist die Tetracyclin-Resistenz nicht bei allen *single-crossover* Klonen gleich gut ausgeprägt, deshalb wurden die potentiell richtigen Tetracyclin sensiblen Klone in einem *Southern-Blot* Experiment überprüft. Klone, bei denen ein *double-crossover* stattgefunden hat, sollten nach der Rekombination nur noch das inaktivierte Gen enthalten. Das Wildtypgen wurde auf das Suizidplasmid rekombiniert und ging auf diesem Wege verloren. Diese Art von Klonen enthielt die gewünschte Deletion im *ntrX* Gen. Von insgesamt 18 im *Southern-Blot* getesteten Klonen wurde einer identifiziert, bei dem ein *double-crossover*-Ereignis stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Dieser Klon wurde zur weiteren Untersuchung verwendet.

4.2.1.2 Charakterisierung der NtrX-Deletionsmutante

Die NtrX-Deletionsmutante zeigte ein stark verlangsamtes Wachstum gegenüber dem Wildtypstamm. Während Platten-Kulturen von *R. capsulatus* SB1003 für 2-3 Tage bei 32°C inkubiert werden müssen bis sichtbare Kolonien herangewachsen sind, braucht *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX etwa 5-7 Tage um zu wachsen. In Flüssigkultur ist das Wachstumsverhalten der Mutante ähnlich verlangsamt. Es dauert 2-4 Tage bis die Kulturen gewachsen sind, während Wildtyp-Kulturen nur 1-2 Tage zum Wachsen brauchen. Sind die Mutanten einmal gewachsen, dann ist die weitere Kultivierung sehr viel einfacher, die Kulturen wachsen dann ähnlich schnell wie der Wildtyp. Im Folgenden schloss sich eine genauere Charakterisierung der NtrX Deletionsmutante an. Im Genom von *R. capsulatus* sind die Gene für das NtrY/NtrX Zweikomponentensystem benachbart zu den Genen *ntrB* und *ntrC* lokalisiert. Diese Gene kodieren für das NtrB/NtrC Zweikomponentensystem, das als Regulator der Stickstoff-Fixierungsgene in *Rhodobacter* fungiert. Deshalb sollte untersucht werden, ob auch NtrY und NtrX in diese Regulation involviert sind. Um festzustellen, ob die

NtrX Deletionsmutanten sich im Wachstum auf Medium verschiedener Ammoniumkonzentration vom Wildtypstamm *R. capsulatus* SB1003 unterscheiden, wurden beide Stämme folgendermaßen angezogen: Dem RÄ-Medium wurden als Stickstoffquelle 2,5 mM, 7,6 mM und 18 mM Ammonium-Sulfat zugesetzt. Ab einer Konzentration von 2,5 mM Ammonium im Medium beginnt *Rhodobacter* mit der verstärkten Synthese der Nitrogenase. Bei 7,6 mM ist die Syntheserate für die Nitrogenase deutlich geringer (Hübner *et al.*, 1993). Während bei 18 mM Ammonium-Sulfat eine optimale Stickstoff-Versorgung im Medium vorliegen sollte. Die *R. capsulatus* Stämme SB1003 und SB1003 Δ NtrX wurden unter phototrophen Bedingungen in RÄ-Medium der beschriebenen Ammoniumkonzentration und gänzlich ohne zugesetztes Ammonium-Sulfat angezogen. Das Wachstumsverhalten der Mutante zeigte keinen Unterschied verglichen mit dem Wildtypstamm. Zur weiteren Untersuchung wurden nachfolgend Absorptionsspektren der Kulturen aufgenommen (Abb. 4.11 bis Abb. 4.14).

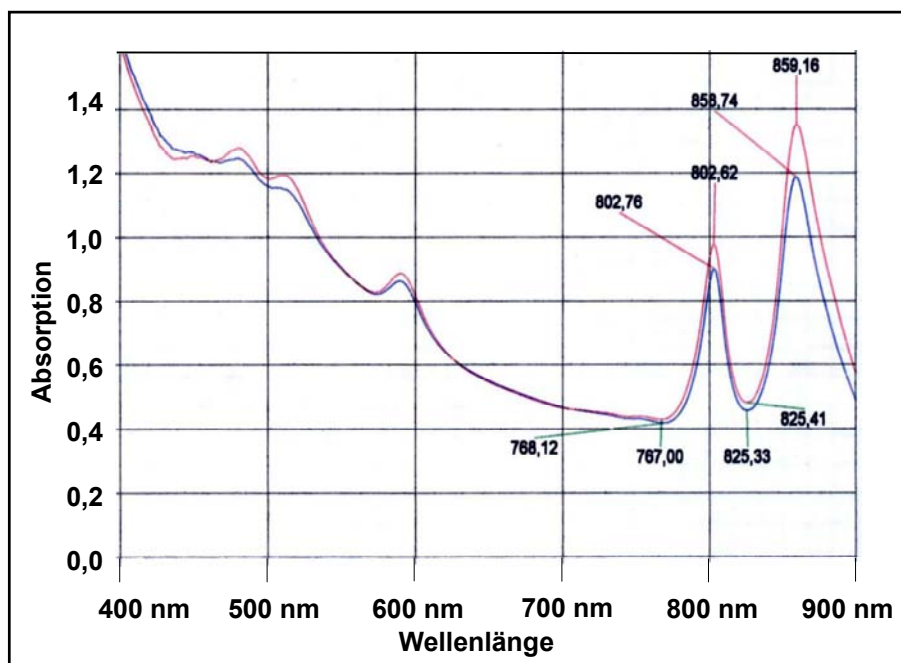


Abb. 4.11: Absorptionsspektrum eines zellfreien Extrakts von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 Δ NtrX ohne Ammoniumzusatz im Medium: Die blaue Kurve repräsentiert den Wildtyp SB1003, die rote die Δ NtrX-Mutante. Die Mutante wies größere Mengen an Photosynthese-Komplexen auf, was an einer Erhöhung der *peaks* bei 803 nm (*peak* LH-II / RC) und 859 nm (*peak* LH-I / LH-II) zu erkennen ist.

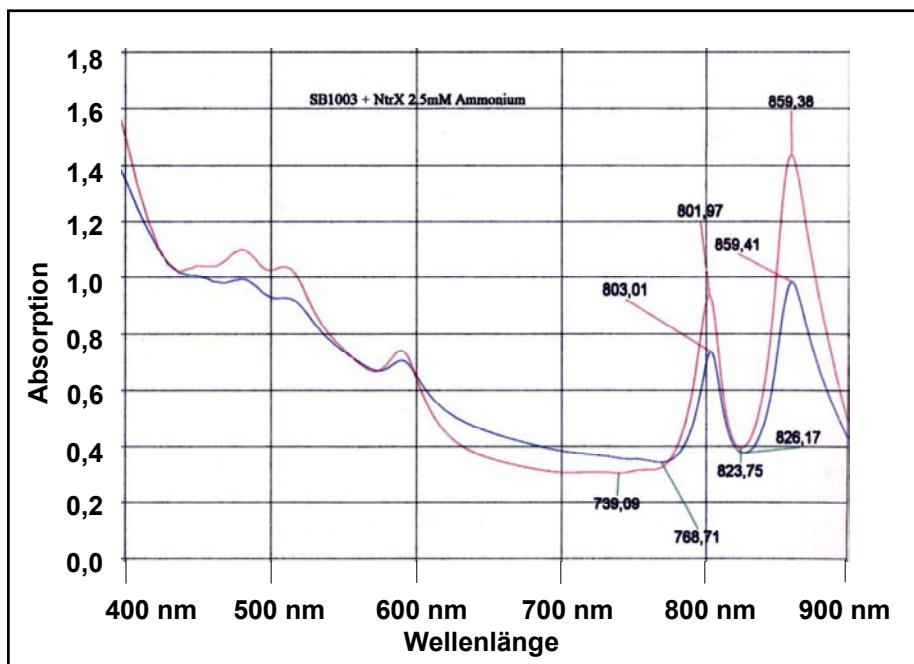


Abb. 4.12: Absorptionsspektrum eines zellfreien Extrakts von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 Δ NtrX bei Zusatz von 2,5 mM Ammonium-Sulfat im Medium: Die blaue Kurve repräsentiert den Wildtyp SB1003, die rote die Δ NtrX-Mutante. Die erhöhte Menge an Photosynthese-Komplexen wurde hier bereits viel deutlicher als bei Kulturen ohne Ammoniumsulfat-Zusatz. Eine Verschiebung des peaks von 803 nm (peak LH-II / RC) zu 802 nm ist bei der Δ NtrX-Mutante bereits zu erkennen.

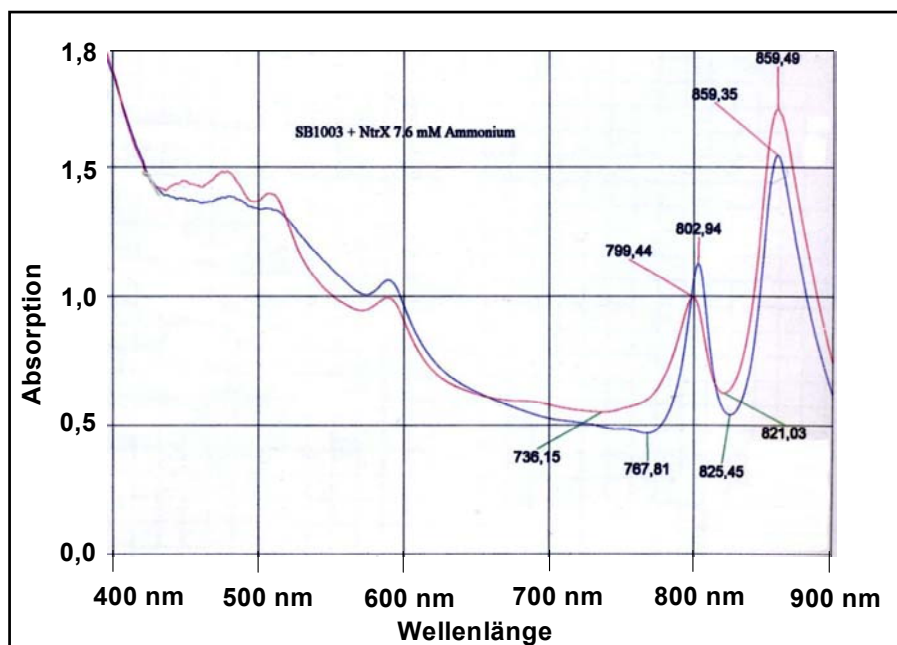


Abb. 4.13: Absorptionsspektrum eines zellfreien Extrakts von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 Δ NtrX bei Zusatz von 7,6 mM Ammonium-Sulfat im Medium: Die blaue Kurve repräsentiert den Wildtyp SB1003, die rote die Δ NtrX-Mutante. Bei Zugabe von 7,6 mM Ammonium-Sulfat wurde die Verschiebung des peaks von 803 nm zu 800 nm ganz deutlich. Außerdem änderte sich das Verhältnis der beiden peaks zueinander. Obwohl der peak bei 859 nm (peak LH-I / LH-II) ähnliche Ausprägung zeigte wie im Wildtyp, blieb der peak bei 800 nm (peak LH-II / RC) stark unter dem Wert des Wildtyps.

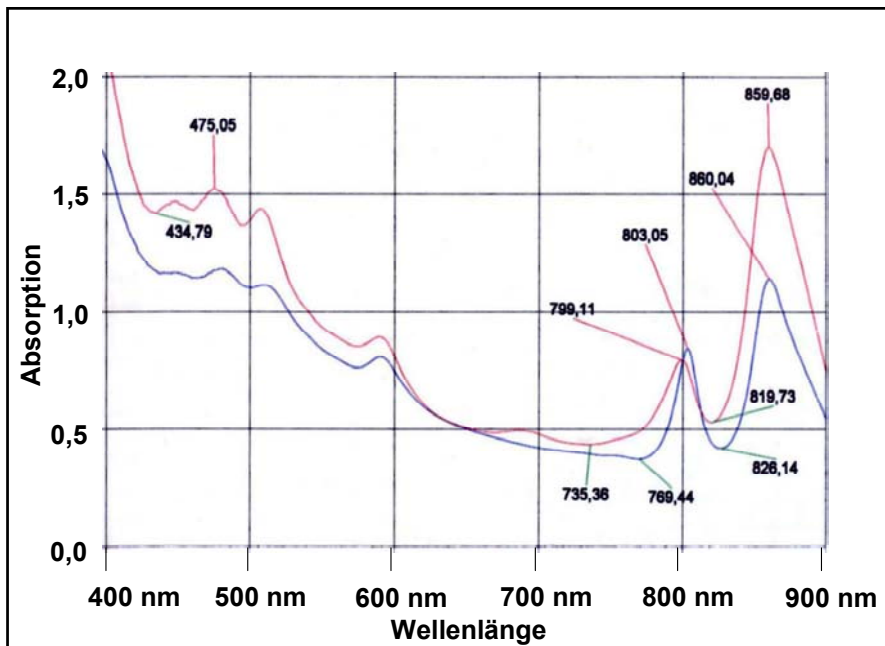


Abb. 4.14: Absorptionsspektrum eines zellfreien Extrakts von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 $\Delta NtrX$ bei Zusatz von 18 mM Ammonium-Sulfat im Medium: Die blaue Kurve repräsentiert den Wildtyp SB1003, die rote die $\Delta NtrX$ -Mutante. Die Abbildung zeigt ein ähnliches Bild wie bereits bei Zugabe von 7,6 mM Ammonium-Sulfat im Medium. Der 803 nm (*peak* LH-II / RC) *peak* wurde nach 800 nm verschoben und das Verhältnis der beiden *peaks* zueinander ist ein anderes als im Wildtyp.

Man erkennt anhand der Spektren, dass die NtrX-Mutante bei allen untersuchten Bedingungen eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Menge an Photosynthese-(PS)-komplexen aufwies. Zur genaueren Untersuchung dieser Mengenunterschiede wurden die Absorptionsspektren wie in Abschnitt 3.1.18 beschrieben quantitativ ausgewertet. Da sich in den Spektren bei 7,6 mM und 18 mM Ammoniumkonzentration im Medium nicht nur die Menge an Photosynthese-Komplexen, sondern auch das Verhältnis der beiden *peaks* bei 803 nm (LH-II / RC) und bei 859 nm (LH-II / LH-I) zueinander veränderte, wurden beide *peaks* des Spektrums einzeln quantifiziert und mit dem Wildtyp verglichen. Weiterhin wurden das Verhältnis der Gesamtmenge an Photosynthese-Komplexen bei NtrX-Mutante und Wildtyp bestimmt. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung sind in Abbildung 4.15 bis 4.18 dargestellt. Man erkennt im Absorptionsspektrum auch deutliche Unterschiede im Wellenlängenbereich oberhalb von 600 nm. Bei etwa 590 nm erscheint im Spektrum ein *peak*, der durch die Absorption von Bakteriochlorophyll hervorgerufen wird. Sowohl freies als auch proteingebundenes Bakteriochlorophyll absorbiert an dieser Stelle. Die *R. capsulatus* SB1003 $\Delta NtrX$ -Mutanten weisen im Vergleich zum Wildtypstamm keinen signifikanten

Unterschied in der Absorption bei 590 nm auf. Bei einer Ammoniumkonzentration von 7,6 mM erscheint der *peak* bei 590 nm etwas kleiner als im Wildtyp, wohingegen er bei 18 mM Ammonium im Medium größer ist als im Wildtypstamm.

Ein weiterer Unterschied bei der Betrachtung der Spektren von *R. capsulatus* Wildtyp und SB1003ΔNtrX-Mutante ist im Bereich von 400-500 nm zu beobachten. In diesem Wellenlängenbereich absorbieren die Carotinoide. Bei allen untersuchten Bedingungen konnten deutlich stärkere Absorptionen der *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX-Mutanten im Bereich von 400-500 nm gemessen werden. Dies spricht für eine größere Menge an Carotinoiden in den NtrX-Deletionsmutanten verglichen mit dem Wildtypstamm *R. capsulatus* SB1003.

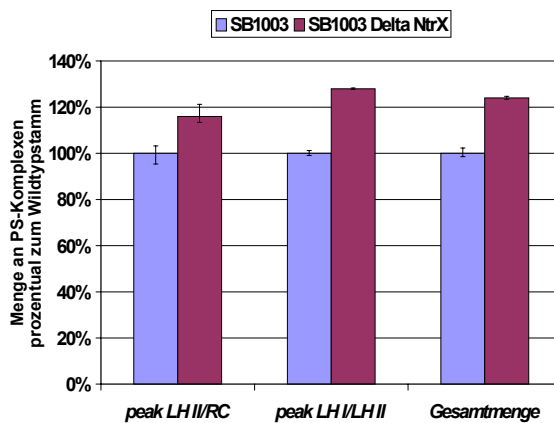


Abb. 4.15: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003ΔNtrX in Medium ohne Stickstoff-Zusatz: Die Größe der *peaks* des Wildtyps wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der SB1003ΔNtrX-Mutante wurden in Relation zu denen des Wildtyps gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge. Die maximale Abweichung vom Mittelwert wurde durch Fehlerbalken angedeutet.

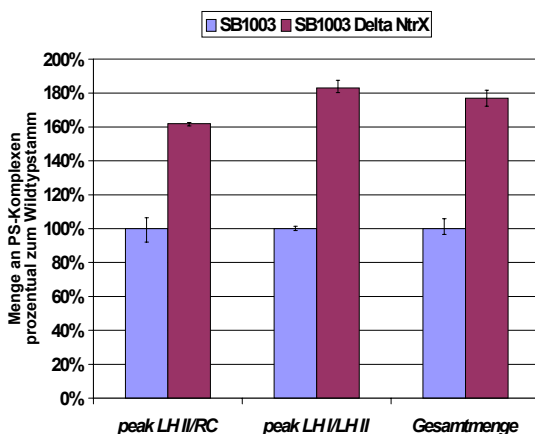


Abb. 4.16: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003ΔNtrX in Medium mit 2,5 mM Ammoniumsulfat: Die Größe der *peaks* des Wildtyps wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der SB1003ΔNtrX-Mutante wurden in Relation zu denen des Wildtyps gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge. Die maximale Abweichung vom Mittelwert wurde durch Fehlerbalken angedeutet.

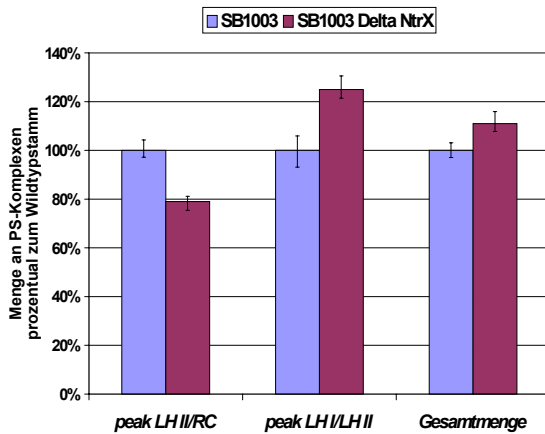


Abb. 4.17: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 Δ NtrX in Medium mit 7,6 mM Ammoniumsulfat: Die Größe der *peaks* des Wildtyps wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der SB1003 Δ NtrX-Mutante wurden in Relation zu denen des Wildtyps gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge. Die maximale Abweichung vom Mittelwert wurde durch Fehlerbalken angedeutet.

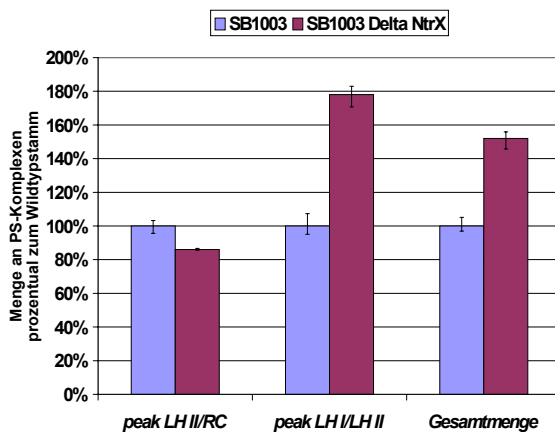


Abb. 4.18: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren von *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 Δ NtrX in Medium mit 18 mM Ammoniumsulfat: Die Größe der *peaks* des Wildtyps wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der SB1003 Δ NtrX-Mutante wurden in Relation zu denen des Wildtyps gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge. Die maximale Abweichung vom Mittelwert wurde durch Fehlerbalken angedeutet.

Für die verschiedenen Stickstoffkonzentrationen ergaben sich die im Folgenden beschriebenen Daten. Enthielt das Medium keinen zugesetzten Stickstoff, so konnte man bereits eine größere Menge an Photosynthese-Komplexen bei der Mutante beobachten. Die Menge an Photosynthese-Komplexen der NtrX-Mutante betrug, bezogen auf den LH-II / RC *peak* (*peak* I), etwa 116 % der Wildtyp-Menge. Der LH-I / LH-II *peak* (*peak* II) war bei der NtrX-Mutante sogar um 128 % erhöht, so dass sich für den Stamm *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX eine Gesamtmenge der PS-Komplexe von 124 % bezogen auf den Wildtyp ergab. Der Effekt war deutlich stärker wenn im Medium 2,5 mM Ammonium vorhanden waren. Hier fand eine drastische Erhöhung statt. Die Menge an *peak* I betrug bei der NtrX-Mutante 163 % des Wildtyps, für *peak* II ergaben sich sogar 183 %. Hieraus berechnete sich eine Gesamtmenge an PS-Komplexen der NtrX-Mutante von 178 % bezogen auf den Wildtyp *R. capsulatus* SB1003. Bei einer Stickstoffkonzentration von 2,5 mM Ammonium im Medium sah man zusätzlich eine

leichte Verschiebung des LH-II / RC *peaks* zu kürzerer Wellenlänge verglichen mit dem Wildtyp. Das Verhältnis der beiden *peaks* zueinander betrug beim Wildtyp in allen Spektren etwa $2,6 \pm 0,3$. Das heißt, der LH-I / LH-II *peak* war um Faktor 2,6 stärker ausgeprägt als der LH-II / RC *peak*. Dieser Wert ließ sich in Medium mit geringer Stickstoffkonzentration auch bei der NtrX-Mutante nachweisen. Stieg die Ammonium-Konzentration im Medium auf 7,6 mM oder sogar 18 mM an, so verschob sich die Absorption des LH-II / RC *peaks* von 803 nm auf 800 nm. Weiterhin veränderte sich das Verhältnis der beiden *peaks* zueinander. Die Menge an LH-II / RC betrug bei 7,6 mM Ammonium nur etwa 79 % des Wildtyps, während die Menge an LH-I / LH-II auf 125 % gesteigert war. Daraus ergab sich, dass der LH-I / LH-II *peak* bei *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX um Faktor 4 größer war als der LH-II / RC *peak*. Bei einer Konzentration von 18 mM Ammonium war dieser Effekt noch ausgeprägter. Hier zeigte der LH-II / RC *peak* etwa 86 % des Wildtyp *peaks*. Die Menge an LH-I / LH-II *peak* war auf 178 % erhöht. Somit ergab sich für die beiden *peaks* ein Verhältnis von 5,8 : 1. In einigen Spektren ist zusätzlich eine Erhöhung der Gesamtbakteriochlorophyllmenge (*peak* bei 595 nm) und eine größere Menge an Carotinoiden (etwa 400-520 nm) feststellbar. Aufgrund dieser Daten sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob NtrX an einer stickstoffabhängigen Regulation von Photosynthesegenen beteiligt ist.

Von der NtrX-Deletionsmutante wurde eine Dauerkultur angelegt. Aus dieser wurden erneut frische Zellen angezogen. Bei der Untersuchung dieser Zellen konnte der eben beschriebene Phänotyp nicht mehr festgestellt werden. Alle Zellen, die aus der Dauerkultur hervorgegangen waren, zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringerte Menge an Photosynthese-Komplexen. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die erhöhte Menge an Photosynthese-Komplexen für die Zellen nachteilige Auswirkungen hatte und sich deshalb nach einiger Zeit Supressormutationen anhäufte, die diesen Effekt kompensierten.

4.2.1.3 Bakteriochlorophyll-Gehalt von NtrX-Mutanten

Da sich die Menge an Photosynthese-Komplexen in NtrX-Deletionsmutanten von *R. capsulatus* erhöht bzw. in den putativen Supressormutanten verringert, sollte in diesem Experiment die Menge an Bakteriochlorophyll in der NtrX-Mutante (mit möglicher Supressormutation) und im Wildtyp SB1003 gemessen werden. Hierzu wurden die *R. capsulatus* Stämme SB1003 und die NtrX-Deletionsmutante SB1003ΔNtrX unter aeroben Bedingungen über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden

Tag wurde die Kultur auf eine OD₆₆₀ von 0,25 verdünnt und unter semiaeroben Bedingungen weiterinkubiert. Diese Umstellung in der Sauerstoff-Verfügbarkeit führt in den Zellen zur Synthese des Photosyntheseapparates. Nach etwa 4 Stunden wurde eine OD₆₆₀ von 0,5 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden 1,5 ml der Kultur entnommen, und es wurde eine Bakteriochlorophyll-Extraktion vorgenommen. Die Bestimmung der Absorption des Extrakts erfolgte bei 770 nm. Die Stärke der Absorption nimmt entsprechend der vorhandenen Bakteriochlorophyll-Menge zu. Anschließend wurde alle 60 min ein Aliquot von 1,5 ml abgenommen und die Bakteriochlorophyll-Menge sowie die OD₆₆₀ bestimmt. Aus dem Quotienten der Absorption bei 770 nm und der optischen Dichte bei 660 nm errechnet sich die relative Menge an Bakteriochlorophyll. Bei dieser Untersuchung konnte über einen Zeitraum von vier Stunden eine deutlich geringere Bakteriochlorophyll-Menge in den SB1003ΔNtrX-Mutanten beobachtet werden. Bei einer OD₆₆₀ von 0,8 enthielten *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX-Zellen etwa 60 % des Bakteriochlorophylls verglichen mit dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Für diese Daten wurden drei Messungen herangezogen und die Werte gemittelt. Da bei diesem Experiment nicht klar war, ob die verwendete Kultur bereits Supressormutationen akkumuliert hatte, konnte keine deutliche Schlussfolgerung über den Bakteriochlorophyll-Gehalt von NtrX-Deletionsmutanten angestellt werden.

4.2.1.4 Komplementation der *R. capsulatus* NtrX-Mutanten

Da die nachträglich aus dem Stamm *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX hervorgegangenen putativen Suppressormutanten alle eine verglichen mit dem Wildtyp verringerte Menge an Photosynthese-Komplexen aufwiesen, sollte durch Komplementations-Untersuchungen die Art der Supressormutation bestimmt werden. Durch Einbringen einer plasmidkodierten Kopie von NtrX in diese Mutanten sollte die Wildtypsituation wiederhergestellt werden. Wenn diese Zelle aber bereits eine Supressormutation enthält, ist es möglich, ihre Auswirkungen auf diesem Wege sichtbar zu machen. Hierzu wurde das Plasmid pRK4-*ntrX* (Klonierung siehe Abschnitt 4.2.1.5) in die NtrX-Deletionsmutanten konjugiert. Bei der Konjugation fiel auf, dass bei Verwendung gleicher Mengen an Rezipienten- bzw. Donorzellen, die Menge an entstandenen Konjuganten bei *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX als Rezipient nur etwa 1 % der Zahl betrug, verglichen mit *R. capsulatus* SB1003 als Empfängerstamm. Der so erhaltene Stamm wurde unter semiaeroben Bedingungen kultiviert und die Zellen anschließend

einer Proteinextraktion unterzogen. Ein Spektrum eines so erhaltenen zellfreien Extrakts ist in Abb. 4.19 gezeigt.

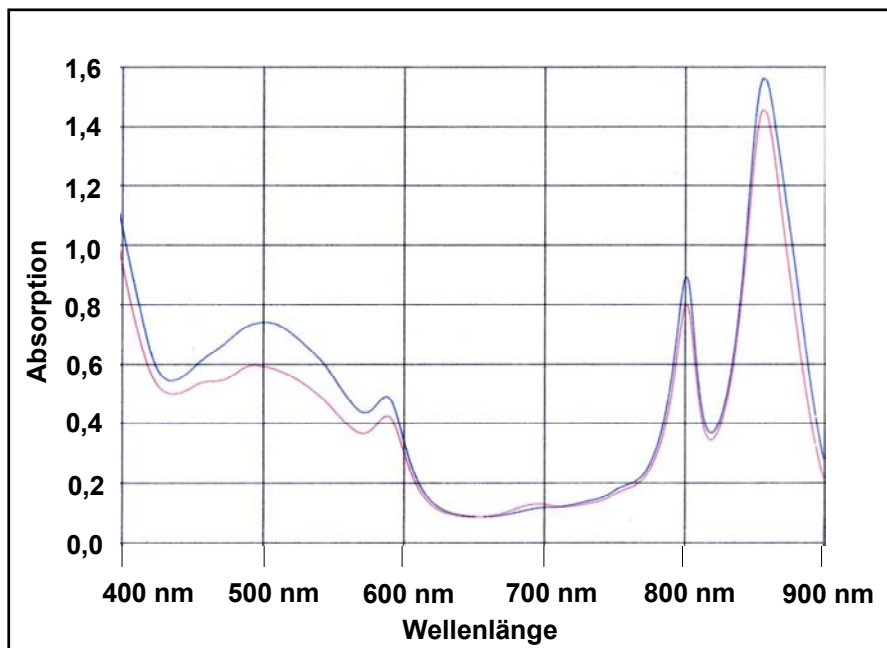


Abb. 4.19: Absorptionsspektrum eines zellfreien Extrakts von *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX und einer mit pRK4-*ntrX* komplementierten NtrX-Mutante: Durch Expression der plasmidkodierten Kopie von NtrX wurde eine Herabsenkung der Menge an Photosynthese-Komplexen erreicht. Die blaue Kurve repräsentiert den Ausgangsstamm SB1003ΔNtrX, die rote Kurve steht für die komplementierte Mutante.

Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen ist, ist die Menge an Photosynthese-Komplexen im komplementierten Stamm geringer, verglichen mit der Menge im Ausgangsstamm. Auch optisch fällt diese Verminderung in der Anzahl der Photosynthese-Komplexe bereits auf. Im Vergleich zum Ausgangsstamm war die komplementierte Kultur bei gleicher optischer Dichte deutlich schwächer gefärbt.

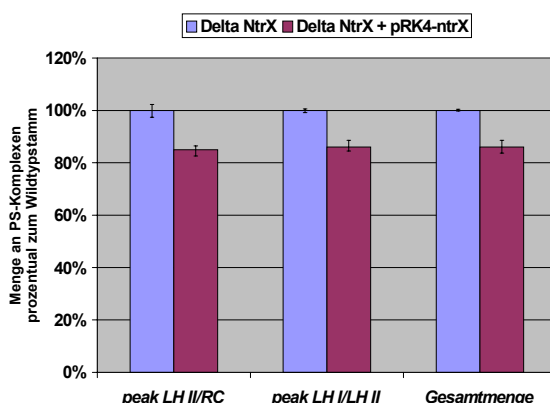


Abb. 4.20: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren von *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX und der mit pRK4-*ntrX* komplementierten Mutante. Die Größe der *peaks* der SB1003 ΔNtrX-Mutante wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der mit NtrX komplementierten Mutante wurden in Relation zu denen des Ausgangsstamms gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge. Die Mengen wurden, wie in Abschnitt 3.1.18 beschrieben, bestimmt.

Durch Einbringen einer plasmidkodierten Kopie von NtrX kommt es zur genetischen Wiederherstellung der Wildtypsituation. Anhand der Komplementation der putativen Suppressormutante des Stammes *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm in der Tat eine verminderte Menge an PS-Komplexen aufwies. Daraus lässt sich schließen, dass die Deletion von NtrX für *R. capsulatus* problematisch ist. Stämme, die den schädlichen Effekt durch Suppressormutationen kompensieren konnten, überwuchsen den Ausgangsstamm nach einiger Zeit. Diese Suppressormutanten zeigten deutlich weniger PS-Komplexe als der Ausgangsstamm *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX. Es ist daher möglich, dass die erhöhte Menge an PS-Komplexen in der NtrX-Deletionsmutante schädlich ist und die Mutation des *ntrX* Gens deshalb nicht stabil war.

4.2.1.5 Überexpression von NtrX in *R. capsulatus*

Eine Deletion von NtrX in *R. capsulatus* hat schwerwiegende Folgen für die Zellen (verlangsamtes Wachstum, verringerte Konjugationsrate und erhöhte Menge an PS-Komplexen). Deshalb sollte in diesem Experiment geprüft werden, wie sich das Vorhandensein von größeren Mengen an NtrX für die Zellen auswirkt. Sollte NtrX als Repressor der Photosynthesegene fungieren, so würde man erwarten, dass die Menge an Photosynthese-Komplexen bei Überexpression von NtrX abnimmt. Um dies zu testen, wurde das *ntrX*-Gen zusammen mit 123 bp *upstream* Sequenz mit den *primern* *ntrX*-77 und *ntrX*-1749 von chromosomaler *R. capsulatus* SB1003 DNA amplifiziert. Die Klonierung erfolgte über die endständigen *Hind*III und *Kpn*I Schnittstellen in den Vektor pRK415. Dieses Plasmid trägt einen IPTG-induzierbaren Promotor und kann in *Rhodobacter* repliziert werden. Zur Untersuchung der Überexpression von NtrX in *Rhodobacter* wurde das Plasmid aus *E. coli* S 17-1 nach *R. capsulatus* SB1003 konjugiert. Anschließend wurden die Bakterien in Medium mit und ohne IPTG angezogen und in Bezug auf ihre Photosynthesepigment-Zusammenstellung hin charakterisiert. Da *Rhodobacter* keinen LacI Repressor besitzt, ist davon auszugehen, dass sich die Expression des *ntrX* Gens nicht über IPTG steuern lässt. Es ist möglich *Rhodobacter*-Deletionsmutanten zu komplementieren, indem ein pRK415-Derivat, das eine Kopie des deletierten Gens trägt, in die Zelle eingeführt wird (vergleiche Abbildung 4.36). Daher sollte die Expression von NtrX vom Plasmid pRK4-*ntrX* aus gewährleistet sein.

Die beiden Stämme *R. capsulatus* SB1003 und *R. capsulatus* SB1003 + pRK4-*ntrX* wurden unter semiaeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₆₀ von etwa 0,9 angezogen

und anschließend für ein Gesamtzell-Absorptionsspektrum verwendet. In Abbildung 4.21 ist beispielhaft ein Absorptionsspektrum des Wildtyps *R. capsulatus* SB1003 und der NtrX überexprimierenden Mutante gezeigt.

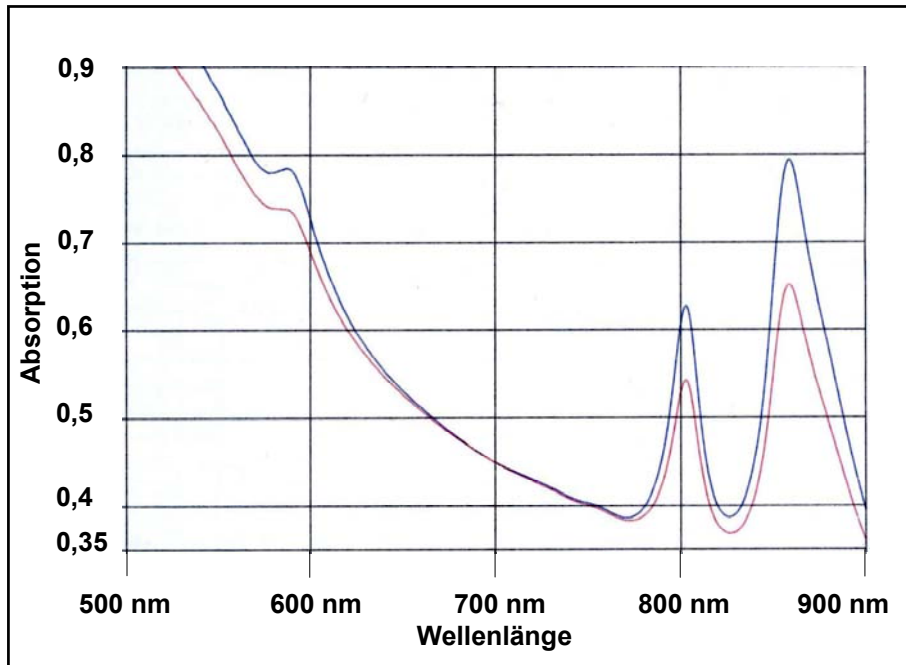


Abb. 4.21: Gesamtzell-Absorptionsspektrum einer Kultur von *R. capsulatus* SB1003 und einer NtrX überexprimierenden Mutante: Die blaue Kurve steht für den Wildtyp SB1003, die rote Kurve repräsentiert den NtrX überexprimierenden Stamm. Die Mutante zeigte eine geringere Anzahl photosynthetischer Komplexe als der Wildtypstamm SB1003.

Die Absorptionsspektren für *R. capsulatus* Wildtypzellen sind reproduzierbar. Bereits kleinere Unterschiede im Spektrum deuten auf eine veränderte Menge oder Zusammensetzung der Photosynthese-Komplexe hin. Es ist zu erkennen, dass die Mutante eine geringere Menge an Photosynthese-Komplexen aufweist als der Wildtyp. Eine Abhängigkeit dieses Effekts von der IPTG-Zugabe im Medium konnte, wie erwartet, nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der quantitativen Auswertung dieser Spektren konnte gezeigt werden, dass die NtrX überexprimierende Mutante etwa 70 % der Menge an Photosynthese-Komplexen synthetisierte, die im Wildtyp nachgewiesen wurde. Das Verhältnis der beiden Absorptions-*peaks* LH-II / RC zu LH-I / LH-II lag, ähnlich wie im Wildtyp, bei Faktor 2,8. Diese Daten sind in Abbildung 4.22 zusammengefasst.

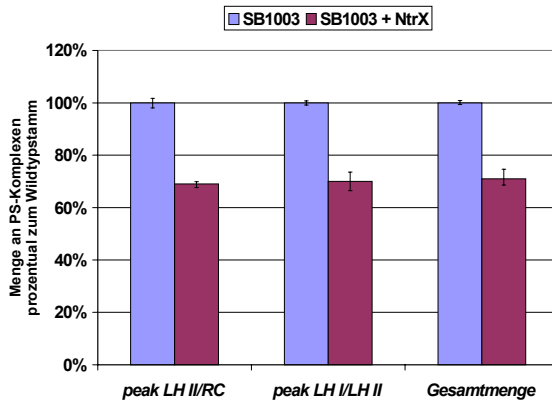


Abb. 4.22: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren von *R. capsulatus* SB1003 und der NtrX überexprimierenden Mutante. Die Größe der *peaks* des Wildtyps SB1003 wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der NtrX überexprimierenden Mutante wurden in Relation zu denen des Ausgangsstamms gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge.

Die Anzucht der beiden Stämme in Medium mit unterschiedlicher Stickstoff-Konzentration hatte keinerlei Auswirkung auf die entstandenen Absorptionsspektren. Unter allen getesteten Bedingungen zeigte die NtrX-überexprimierende Mutante eine geringere Menge an Photosynthese-Komplexen (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.6 Deletion von NtrX in *R. capsulatus* Δ RC6

Es wurde gezeigt, dass eine Deletion von NtrX im Wildtyp von *R. capsulatus* nicht stabil ist, und dass sich in diesen Zellen wahrscheinlich Supressormutationen anhäufen, die die Menge an Photosynthese-Komplexen herabsetzen. Deshalb sollte weitergehend untersucht werden, ob eine NtrX Deletion in einem Stamm stabil ist, der eine Deletion im Bereich des *puf*-Operons besitzt. Das *puf*-Operon kodiert die Strukturproteine des Reaktionszentrums (RC) und des Antennenkomplexes I (LH-I) des PS-Apparates. Die Deletion im Bereich des *puf*-Operons führt dazu, dass der entsprechende Stamm keine Photosynthese betreiben kann, wohl aber in der Lage ist, eine geringe Menge an PS-Komplexen herzustellen. Da der entsprechende Stamm *R. capsulatus* Δ RC6 bereits eine Kanamycin-Resistenzkassette trägt, die zur Deletion des *puf*-Operons führt, musste für die Konstruktion der *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX Doppelmutante eine Gentamycin-Kassette eingesetzt werden. Hierzu wurde das Plasmid pDG9-3II (Giaourakis und Klipp, unveröffentlicht) verwendet. Dieses Plasmid ist ein Suizidplasmid, das in *Rhodobacter* nicht repliziert werden kann. Es trägt flankierende homologe Bereiche des *ntrX* Gens und eine im Gen inserierte Gentamycin-Resistenzkassette. Mit diesem Plasmid sollte es möglich sein, das chromosomale *ntrX* Gen zu inaktivieren. Das Plasmid pDG9-3II, das Tetrazyklinresistenz verleiht, wurde in *E. coli* S17-1 transformiert und nach *R. capsulatus* Δ RC6 konjugiert. Von etwa 1000 gewachsenen Klonen wurden 200 auf Sensitivität gegenüber Tetrazyclin getestet. Diese gegenüber Tetrazyclin sensitiven Klone wurden anschließend in einem *Southern-Blot* getestet

(vergleiche Abschnitt 4.2.1.1). Einer dieser Klone zeigte das gewünschte *double-crossover*; das chromosomale *ntrX*-Gen wurde durch die Gentamycin-Kassette inaktiviert (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.7 Charakterisierung der *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX-Mutante

Die *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX-Doppelmutante zeigte verglichen mit der *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX-Mutante ein deutlich besseres Wachstum. Betrachtet man ein Gesamtzell-Absorptionsspektrum einer semiaerob kultivierten *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX-Mutante, so war zu erkennen, dass dieser Stamm mehr Photosynthese-Komplexe aufwies als der Ausgangsstamm *R. capsulatus* Δ RC6.

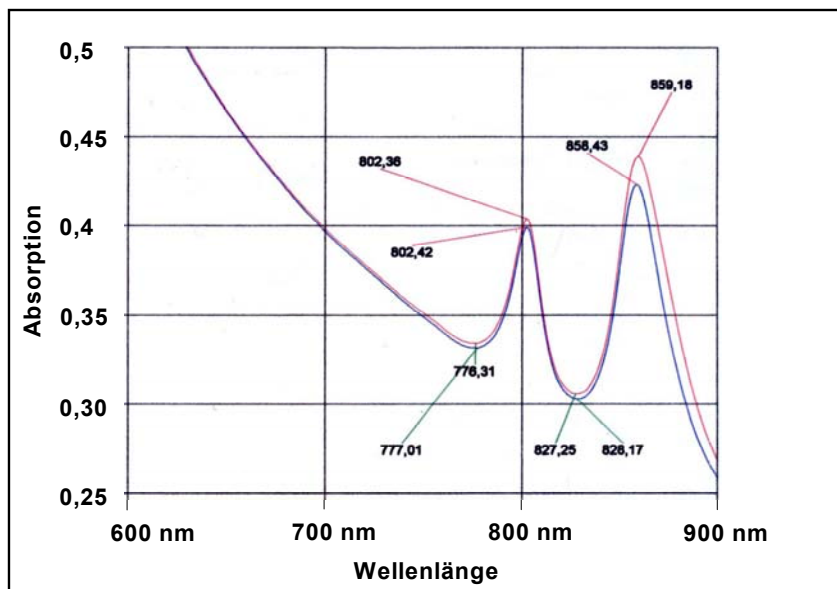


Abb. 4.23: Gesamtzell-Absorptionsspektrum der *R. capsulatus* Stämme Δ RC6 und Δ RC6 Δ NtrX: Die blaue Kurve zeigt das Spektrum des Ausgangsstamms Δ RC6, die rote Kurve repräsentiert die Δ RC6 Δ NtrX-Mutante. Beide Stämme wiesen eine sehr geringe Menge an Photosynthese-Komplexen auf, da im Ausgangsstamm ein Deletion im Bereich des *puf*-Operons vorliegt. Trotzdem war erkennbar, dass die Δ RC6 Δ NtrX-Mutante eine im Vergleich zum Ausgangsstamm höhere Menge an Photosynthese-Komplexen aufwies.

Insgesamt konnten bei *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX etwa 19 % mehr Photosynthese-Komplexe als bei *R. capsulatus* Δ RC6 gefunden werden. Der LH-II / RC *peak* war in der Δ RC6 Δ NtrX-Mutante auf etwa 109 % erhöht. Der LH-I / LH-II *peak* zeigte sogar 122 % der im Wildtyp bestimmten Menge an Photosynthese-Komplexen. Dieses Ergebnis würde dafür sprechen, dass NtrX als Repressor der Photosynthesegene in *Rhodobacter* fungieren könnte. Eine Verschiebung eines *peaks*, wie es bei der SB1003 Δ NtrX-Mutante zu beobachten war, konnte hier nicht festgestellt werden. Das

Verhältnis der beiden *peaks* zueinander betrug 1 : 2,9. Dieser Wert befand sich noch im Varianzbereich des Wildtyps.

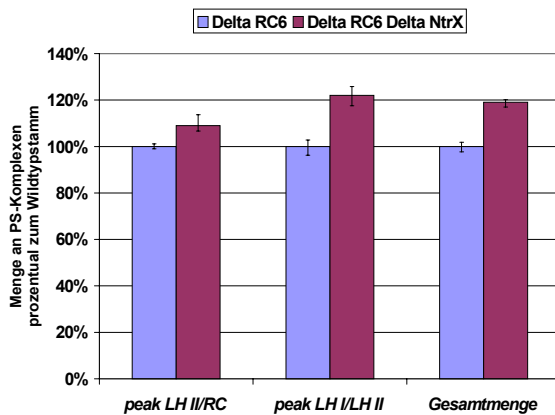


Abb. 4.24: Quantitative Auswertung der Absorptionsspektren der *R. capsulatus* Stämme Δ RC6 und Δ RC6 Δ NtrX Die Größe der *peaks* der Δ RC6-Mutante wurde auf 100 % festgelegt. Die *peaks* der Δ RC6 Δ NtrX-Mutante wurden in Relation zu denen des Ausgangsstamms gesetzt. Verglichen wurde jeweils die Menge an LH-II / RC (*peak* I), LH-I / LH-II (*peak* II) und die Gesamtmenge. Die maximale Abweichung vom Mittelwert wurde durch Fehlerbalken angedeutet.

Auch der Phänotyp der Doppelmutante *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX erwies sich als instabil. Nach einiger Zeit entstanden wahrscheinlich Mutanten, die den Effekt der erhöhten Menge an Photosynthese-Komplexen durch Suppressormutationen kompensierten. Da der Ausgangsstamm *R. capsulatus* Δ RC6 bereits eine stark verminderte PS-Komplex-Menge aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur die erhöhte Menge an PS-Komplexen zur Instabilität des Phänotyps der NtrX-Mutante führte, sondern noch weitere Faktoren eine Rolle spielten.

4.2.1.7.1 *puf*-Promotor-Aktivität in *R. capsulatus* Δ RC6 und RC6 Δ NtrX

Zur weiteren Charakterisierung der *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX Doppelmutante sollte die *puf*-Promotor Aktivität in diesem Stamm bestimmt werden. Falls NtrX an der Regulation des *puf*-Operons beteiligt ist, sollten sich Unterschiede in der Aktivität des *puf*-Promotors zwischen den *R. capsulatus* Stämmen Δ RC6 und Δ RC6 Δ NtrX zeigen. Hierzu wurde das Plasmid pWTSAlacZ in beide Stämme konjugiert. Dieses Plasmid trägt eine *puf*-Promotor-*lacZ*-Fusion mit der die Aktivität des Promotors anhand von β -Galaktosidase-Messungen untersucht werden kann. Auch bei dieser Konjugation zeigte die NtrX Deletionsmutante wieder eine sehr geringe Anzahl an Konjuganten. Die erhaltenen Stämme wurden dann zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in semiaeroben Kulturen bis zu einer OD₆₆₀ von 0,9 angezogen. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Kultur zentrifugiert und in einem β -Galaktosidase-*assay* untersucht. Die Werte sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

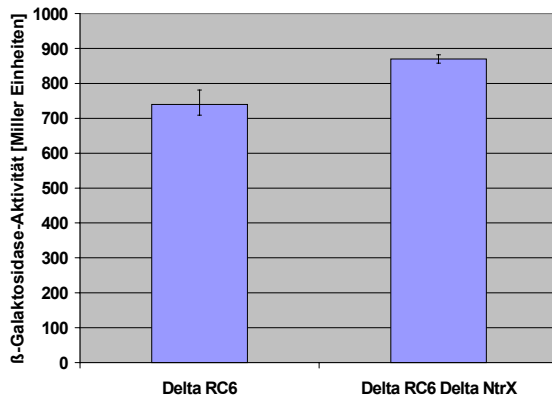


Abb. 4.25: β-Galaktosidase-Aktivität *R. capsulatus* Stämme ΔRC6 und ΔRC6ΔNtrX: Die Abbildung zeigt, dass die Doppelmutante ΔRC6ΔNtrX eine höhere β-Galaktosidase-Aktivität aufwies als der Ausgangsstamm ΔRC6. Die maximale Abweichung vom Mittelwert wurde durch Fehlerbalken angedeutet.

Tendenziell war erkennbar, dass die Doppelmutante eine höhere β-Galaktosidase-Aktivität aufwies als der Ausgangsstamm. Leider ließ sich auch dieses Experiment nicht reproduzieren, da die Doppelmutante auf Grund mangelnder Stabilität ihre erhöhte Expression der Photosynthese-Komplexe einstellte. Dies wirkte sich dann ebenfalls auf die Untersuchungen im β-Galaktosidase-assay aus. Deshalb wurden für das in Abbildung 4.25 gezeigte Diagramm nur jeweils drei Einzelwerte pro Stamm gemittelt.

4.2.2 Charakterisierung der Interaktion von NtrX und RegA *in vitro*

Zur Bestätigung der im Hefe 2-Hybridsystem gefundenen Interaktion von NtrX und RegA und zur genaueren Charakterisierung der Wechselwirkung der beiden Proteine *in vitro* sollten RegA und NtrX aus *E. coli* aufgereinigt werden. Zur besseren Handhabbarkeit während der Experimente wurden beide Proteine mit verschiedenen sogenannten *affinity tags* versehen. Das RegA Protein trägt ein Hexa-Histidin-tag, das an Ni-NTA-Agarose binden kann. NtrX wird als Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert. Diese kann eine Bindung mit Glutathion-Sephrose eingehen. Weiterhin sollte in Gelretardationsexperimenten überprüft werden, ob NtrX direkt an die Promotoren der PS-Operons *puf* und *puc* binden kann.

4.2.2.1 Aufreinigung von His₆-RegA aus *E. coli*

Die Überexpression von His₆-RegA wurde nach Induktion mit 1 mM IPTG in *E. coli* M15[pQEregA; pREP4] durchgeführt. Das Protein wurde wie in 3.5.1 beschrieben isoliert. Abbildung 4.26 zeigt ein silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit verschiedenen Fraktionen des aufgereinigten Proteins. RegA hat ein Molekulargewicht von 21 kD. Bei dieser Art der Aufreinigung war es nicht möglich das Protein zur Homogenität zu

isolieren. Es befanden sich immer einige kontaminierende Proteine in den entsprechenden Fraktionen.

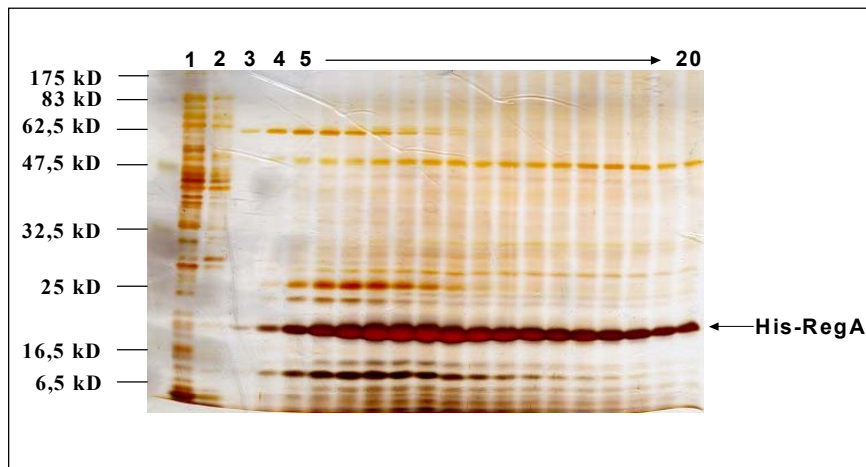


Abb. 4.26: Aufreinigung von His₆-RegA aus *E. coli*: Diese Abbildung zeigt ein 12 %-iges PAA-Gel, auf dem die proteinhaltigen Fraktionen nach einer Aufreinigung von His-RegA über Nickel-NTA-Agarose elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das Gel wurde nach der Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen. Als Größenmarker diente der NEB *broadrange* Proteinmarker. **Spur 1:** Durchfluss nach Bindung der Proteine an Nickel NTA-Agarose, nicht gebundene Proteine sind hier zu sehen; **Spur 2:** Waschfraktion; **Spur 3 bis 20:** Fraktionen der Aufreinigung von His-RegA. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 21 kDa.

4.2.2.2 Aufreinigung von GST-NtrX aus *E. coli*

Für die Herstellung von GST-NtrX musste zunächst das *ntrX*-Gen aus *R. capsulatus* in den Überexpressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert werden. Hierzu wurde das *ntrX*-Gen aus *R. capsulatus* SB1003 mittels PCR mit den primern *ntrX*-201 und *ntrX*-1749 von chromosomaler DNA amplifiziert. Beide *primer* tragen endständig eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI bzw. *Xho*I. Nach Spaltung mit beiden Enzymen wurde das 1548 bp große DNA-Fragment in den ebenfalls geschnittenen Vektor pGEX-4-T-1 kloniert. Das Plasmid wurde anschließend zur Überexpression von GST-NtrX in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 angezogen und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Nach dreistündiger Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert und bis zur Isolierung des Proteins bei -80°C gelagert. Die Isolierung erfolgte wie in 3.5.2 beschrieben. In Abbildung 4.27 sieht man ein 12 %-iges PAA-Gel mit den Fraktionen nach der Elution von der Glutathion-Sepharose. Das NtrX-Protein hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von etwa 48 kD. Die Größe der angehängten Glutathion-S-Transferase beträgt etwa 30 kD. Hieraus ergibt sich eine Molekülgröße

von etwa 80 kD. Das aufgereinigte GST-NtrX läuft in einer denaturierenden SDS-PAGE bei etwa 70 kD. Die erhaltenen Mengen an GST-NtrX waren immer deutlich geringer als bei der Aufreinigung von His₆-RegA. Allerdings konnte GST-NtrX fast bis zur Homogenität aufgereinigt werden.

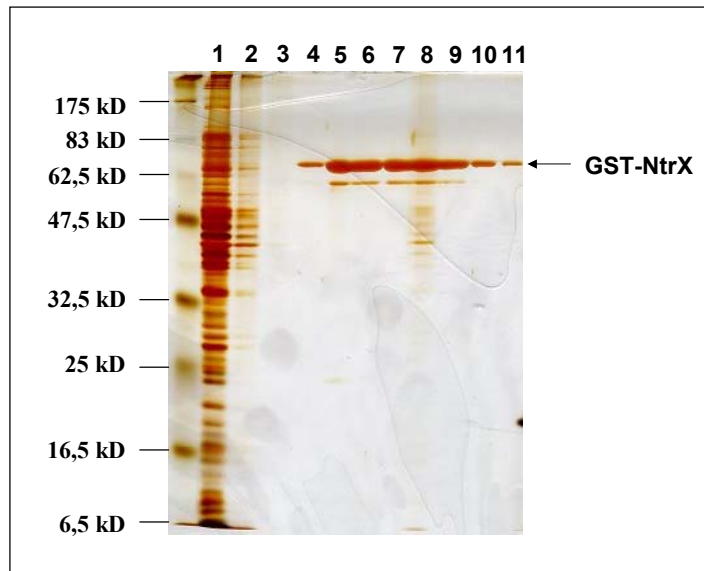


Abb. 4.27: Aufreinigung von GST-NtrX aus *E. coli*: Diese Abbildung zeigt ein 12 %-iges PAA-Gel, auf dem die proteinhaltigen Fraktionen nach einer Aufreinigung von GST-NtrX über Glutathion-Sepharose elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das Gel wurde nach der Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen. Als Größenmarker diente der NEB *broadrange* Proteinmarker. **Spur 1:** Durchfluss nach Bindung der Proteine an Glutathion-Sepharose, nicht gebundene Proteine sind hier zu sehen; **Spur 2:** Waschfraktion; **Spur 3 bis 11:** Fraktionen der Aufreinigung von GST-NtrX. Bei etwa 70 kDa migriert das GST-NtrX-Protein.

Durch die Untersuchung der NtrX-Deletionsmutanten lässt sich vermuten, dass NtrX an der Regulation der Photosynthesegene in *Rhodobacter capsulatus* beteiligt ist. Um festzustellen, ob eine direkte Interaktion von NtrX mit den Promotorregionen der Photosynthesegene stattfindet, wurden Gelretardations-*assays* mit den Promotorregionen des *puf*- und des *puc*-Operons gemacht.

4.2.2.3 Gelretardationsexperimente mit dem *puf*-Promotor

NtrX ist ein *response* Regulator der NtrC-Klasse. Diese zeigen eine Bindung an sogenannte *enhancer*-Regionen, die sowohl *upstream* als auch *downstream* des Transkriptionsstarts des zu regulierenden Gens liegen können (Reitzer und Magasanik, 1986). Um die Interaktion von NtrX mit der *puf*-Promotor-Region zu untersuchen wurden verschieden große DNA-Fragmente eingesetzt. In Abbildung 4.28 sind die

unterschiedlichen Fragmentgrößen und der jeweilige Abstand vom Transkriptionsstart angegeben.

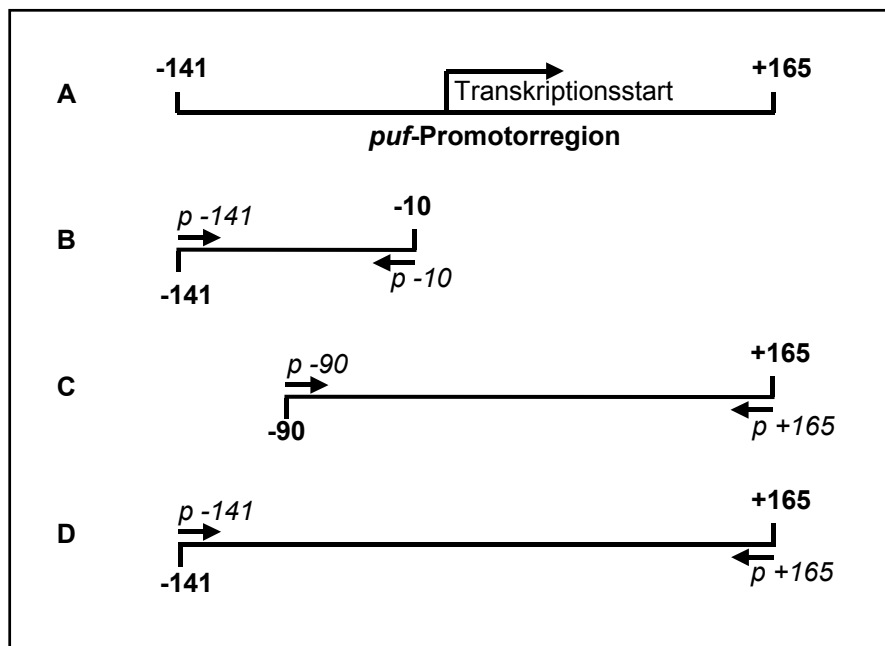


Abb. 4.28: DNA-Fragmente der *puf*-Promotorregion für Gelretardationsexperimente: Die gezeigten DNA-Fragmente beinhalten verschiedene Teile der *puf*-Promotorregion. Die Zahlenangaben beziehen sich auf den Abstand der jeweiligen Base relativ zum Transkriptionsstart. Die in den Abbildungen B, C und D angedeuteten Pfeile stehen für *primer*, die zur Amplifikation der jeweiligen Fragmente benutzt wurden. **A:** Die Abbildung zeigt die *puf*-Promotorregion von Position -141 bis Position +165 relativ zum Transkriptionsstart. Der Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil angedeutet; **B:** Dieses Fragment trägt die Region *upstream* vom Transkriptionsstart von Position -141 bis -10; **C:** Dieses Fragment trägt den Bereich von Position -90 bis +165 relativ zum Transkriptionsstart; **D:** Das hier amplifizierte Fragment trägt die Promotorregion von Position -141 bis +165.

Alle Fragmente für Gelretardationsexperimente wurden in einer PCR mit dem Plasmid pCX-34 hergestellt. Die Amplifikate wurden aus einem 3,5 %-igen *low melting* Agarosegel aufgereinigt. Anschließend erfolgte die radioaktive Markierung über das Anhängen eines endständigen Phosphats. Für das Gelretardations-*assay* wurden 8 µg NtrX eingesetzt. Eine Bindung von NtrX an die *puf*-Promotor-Region konnte nicht festgestellt werden (Abb. 4.29). In weiteren Experimenten sollte der Einfluss von RegA auf die Bindung von NtrX an die *puf*-Promotorregion untersucht werden. Hierzu wurden den Reaktionen verschiedene Konzentration von gereinigtem His₆-RegA zugesetzt. RegA alleine zeigt bereits eine Bindung an die *puf*- und *puc*-Promotorregion. Deshalb wurde versucht, die Menge an RegA-Protein so gering zu halten, dass die Bindung von RegA an die DNA im Experiment nicht mehr sichtbar wurde. Die Menge an RegA lag hier bei etwa 0,25 µg pro Ansatz im Gelretardationsexperiment.

Anschließend wurden dem Ansatz des Gelretardations-*assays* zusätzlich 8 µg GST-NtrX zugefügt. Nun sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von RegA einen Einfluss auf das Bindungsverhalten von GST-NtrX hat. Bei diesen Experimenten war es nicht möglich eine reproduzierbare Aussage zu gewinnen. In manchen Gelretardations-*assays* führte die Zugabe von RegA zu einer schwachen Bindung der DNA-Fragmente *puf* -141 bis +165 und *puc* -290 bis +140 (vergleiche Abschnitt 4.2.2.4). Dieses Ergebnis konnte aber nicht für alle Gelretardations-*assays* reproduziert werden. Weiterhin bleibt unklar, welches der beiden Proteine an die DNA-Fragmente gebunden hat. Die Höhe der Bande nach dem *shift* migrierte weiter unten im Gel, als der von RegA produzierte *bandshift*. Deshalb konnte die Bande weder RegA zugeordnet werden, noch konnte sie als *supershift* gewertet werden, welcher eine Bindung beider Proteine angedeutet hätte (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.4 Gelretardationsexperimente mit *puc*-Promotor

In diesem Experiment sollte getestet werden, ob NtrX an die *puc*-Promotorregion binden kann. Hierzu wurde ein etwa 440 bp großes PCR-Produkt mit den *primern* *p* -300 und *p* +140 und dem Plasmid pGE3-4,5 als *template* amplifiziert.

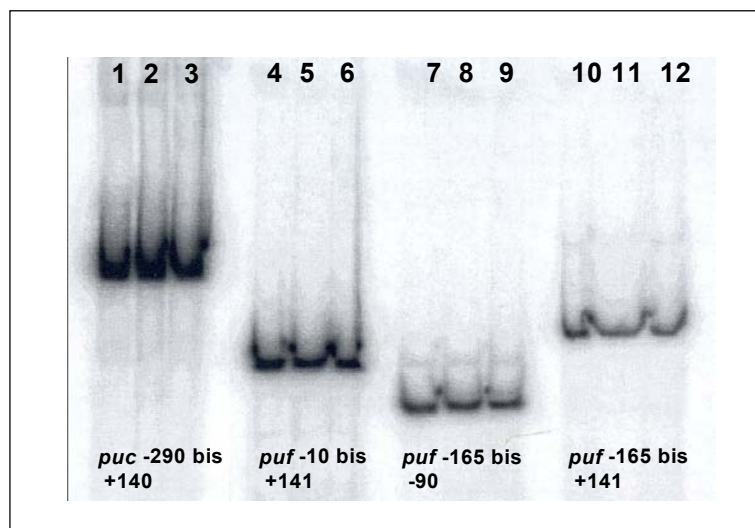


Abb. 4.29: Untersuchung des Bindungsverhaltens von GST-NtrX an die *puf*- bzw. *puc*-Promotorregion: Die Abbildung zeigt ein Bild eines *imaging screens*, auf dem ein Gel eines Gelretardations-*assays* exponiert wurde. Nach Inkubation von GST-NtrX und den einzelnen DNA-Fragmenten konnte im Gelretardations-*assay* keine Wechselwirkung von Protein und DNA festgestellt werden. **Spur 1-3:** *puc* -290 bis +141; **Spur 4-6:** *puf* -165 bis -10; **Spur 7-9:** *puf* -90 bis +141; **Spur 10-12:** *puf* -165 bis +141. Die **Spuren 1, 4, 7 und 10** enthalten kein Protein; die **Spuren 2, 5, 8 und 11** enthalten jeweils 4 µg GST-NtrX und die **Spuren 3, 6, 9 und 12** enthalten 8 µg GST-NtrX.

Die Amplifikate wurden aus einem 2 %-igen Agarosegel aufgereinigt. Anschließend erfolgte die radioaktive Markierung durch Anhängen eines endständigen Phosphats. Das Gelretardations-*assay* wurde wie in 4.2.2.3 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 4.29 sieht man das Ergebnis eines solchen Versuchs. Es ist erkennbar, dass NtrX keine Bindung an das DNA-Fragment zeigt. NtrX bindet also weder die *puf*-, noch die *puc*-Promotor-Region.

4.2.2.5 Phosphorylierung und Mutagenese von GST-NtrX

Eine Reihe von *response* Regulatoren ist nur in phosphoryliertem Zustand in der Lage an DNA zu binden. Deshalb wurden 8 µg GST-NtrX mit 100 mM Acetylphosphat in eine Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Diese Reaktionen wurden anschließend für Gelretardations-Experimente weiterverwendet. Allerdings zeigte sich auch nach der Phosphorylierungsreaktion keine Bindung von NtrX an die bereitgestellten DNA-Fragmente (Daten nicht gezeigt). Da für die Phosphorylierung nicht-radioaktives Acetylphosphat verwendet wurde, fehlt der Nachweis, dass die Phosphorylierungsreaktion erfolgreich war. Aus diesem Grund wurde für weitergehende Untersuchungen eine Mutagenese von NtrX durchgeführt.

Es ist bekannt, dass die Aktivität eines Proteins, durch den Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb des Moleküls, verändert werden kann. Im Falle einiger *response* Regulatoren führt der Austausch des zur Phosphorylierung essentiellen Aminosäurerests zu einem geänderten Bindungsverhalten bezüglich der DNA. Für NtrC zum Beispiel, ein zu NtrX homologes Protein (Pawlowski *et al.*, 1991), konnte gezeigt werden, dass der Austausch der phosphorylierbaren Aminosäure Aspartat 54 zu Asparagin einen Aktivitätsverlust des Proteins zur Folge hatte. Andererseits führte das Ersetzen von Aspartat 54 durch Glutamat zu einer konstitutiv aktiven Form des Proteins (Klose *et al.*, 1993). Durch eine gezielte Mutagenese von NtrX sollte untersucht werden, ob es auch für NtrX möglich ist, eine konstitutiv aktive und eine phosphorylierungs-inaktive Variante des Proteins herzustellen. Der Vergleich beider Proteine würde Aufschluss darüber geben, ob NtrX im phosphorylierten Zustand in der Lage ist, an die Promotorregionen der Photosynthese-Operons zu binden.

Hierzu wurde das als putativer Phosphorylierungsrest benutzte Aspartat 52 (vergleiche Abb. 4.8) in ein Glutamat für die aktive Form, oder in ein Asparagin im Falle des nicht mehr phosphorylierbaren Proteins überführt. Für beide Aminosäure-Austausche war es lediglich erforderlich eine einzelne Base innerhalb der Nukleotidsequenz auszutauschen. Die Mutation wurde durch eine *overlay extension* PCR eingeführt.

Hierbei wurden zwei *primer* verwendet, die sich in ihrer Sequenz in der gewünschten Base von der Wildtypsituation unterscheiden. Der D52N bzw. D52E *antisense primer* wurde in eine PCR mit dem zweiten *primer ntrX-201* eingesetzt; der D52N bzw. D52E *sense primer* in eine Reaktion mit dem *primer ntrX-1729*. Die beiden so entstandenen DNA-Fragmente von 200 bp bzw. 1400 bp, die im Bereich der zu mutagenisierenden Sequenz überlappen, wurden dann in eine zweite PCR eingesetzt. Zu Anfang wurde die Reaktion für 8 min auf 96°C erhitzt um beide DNA-Moleküle zu denaturieren. Danach erfolgte die Hybridisierung beider Stränge an der überlappenden Sequenz. Während dieses 10-minütigen *annealings* bei 65°C verlängerte die *Taq*-Polymerase die DNA-Stränge und ein neues doppelsträngiges *template* von etwa 1600 bp entstand. Durch Zugabe der beiden äußeren *primer ntrX-201* und *ntrX-1729* konnte dieses mutagenisierte DNA-Fragment amplifiziert werden. Anschließend erfolgte die Klonierung des Gens, über die von der *Taq*-Polymerase endständig angehängten A-Überhänge, in einen T-Vektor. Aus diesem konnten die entsprechenden *inserts* mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I im Falle von D52N und mit *Bam*HI und *Sal*I im Fall von D52E ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert werden. In der Mutante D52E wurde zusätzlich zum Aminosäureaustausch von Aspartat zu Glutamat auch eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xho*I geschaffen. Deshalb wurde die Klonierung über *Sal*I und *Bam*HI notwendig. Die so generierten Plasmide pGEX-*ntrX*-D52N und pGEX-*ntrX*-D52E wurden anschließend sequenziert. Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass zusätzlich zur gezielten Mutation noch einige unerwünschte Basenaustausche stattfanden. Bei D52N wurde zusätzlich zur gewünschten Mutation noch Aspartat 410 durch Glycin ersetzt. Bei D52E wurden mehrere Fehler in der Sequenz gefunden. So wurden hier zusätzlich Lysin 390 durch Glutamat, Glutamin 365 durch Arginin und Arginin 306 durch Histidin ersetzt. Die Plasmide wurden nach der Sequenzierung in *E. coli* BL21 transformiert, die Proteine wurden überexprimiert und die Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde wie in Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Für die Expression von NtrX-D52E erwies es sich als notwendig die Kulturen bei einer Temperatur von 17°C zu induzieren. Bei höheren Temperaturen war die Proteinausbeute sehr gering. Weiterhin zeigten die Fraktionen nach der Proteinreinigung von GST-NtrX-D52E auch noch einige wenige kontaminierende Proteine.

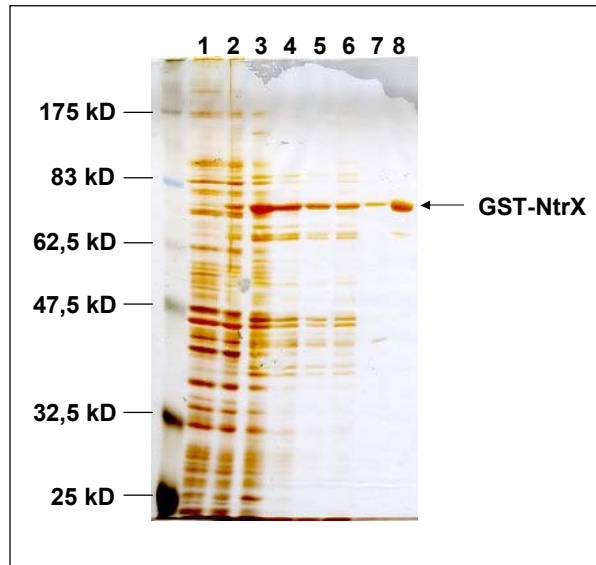


Abb. 4.30: Aufreinigung von GST-NtrX D52E aus *E. coli*: Diese Abbildung zeigt ein 12 %-iges PAA-Gel, auf dem die proteinhaltigen Fraktionen nach einer Aufreinigung von GST-NtrX D52E über Glutathion-Sepharose elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das Gel wurde nach der Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen. Als Größenmarker diente der NEB *broadrange* Proteinmarker. **Spur 1:** Durchfluss nach Bindung der Proteine an Glutathion-Sepharose, nicht gebundene Proteine sind hier zu sehen; **Spur 2:** Waschfraktion; **Spur 3 bis 7:** Fraktionen der Aufreinigung von GST-NtrX. **Spur 8:** GST-NtrX wt. Bei etwa 70 kDa migriert das GST-NtrX-Protein.

4.2.2.6 Gelretardationsexperimente mit der *puc*- und der *puf* Promotorregion

Für die Untersuchung des Bindungsverhaltens des Wildtyp NtrX-Proteins (wt) und der NtrX-Varianten NtrX-D52N und NtrX-D52E an die *puf*- bzw. die *puc*-Promotorregion wurden die bereits in Abschnitt 4.2.2.3 und 4.2.2.4 beschriebenen DNA-Fragmente verwendet. Sie wurden mit 1 bzw. 2 µg des jeweiligen NtrX-Proteins in ein Gelretardations-Experiment eingesetzt. Die veränderten Proteine NtrX-D52N und NtrX-D52E zeigten genau wie NtrX-wt keine Bindung an die *puc*-Promotorregion. Auch mit der *puf*-Promotorregion interagierte weder NtrX-wt noch NtrX-D52N (Daten nicht gezeigt). NtrX-D52E allerdings zeigte eine deutliche Bindung an zwei der verwendeten *puf*-Promotor-Fragmente (Abb. 4.31). Interessanterweise interagierte NtrX-D52E mit den Fragmenten *puf*–90 bis +141 und *puf*–165 bis +141. Eine Bindung an *puf* –165 bis –10 konnte nicht nachgewiesen werden. Damit wurden nur DNA-Fragmente gebunden, die Sequenzen trugen, die *downstream* des Transkriptionsstarts lagen.

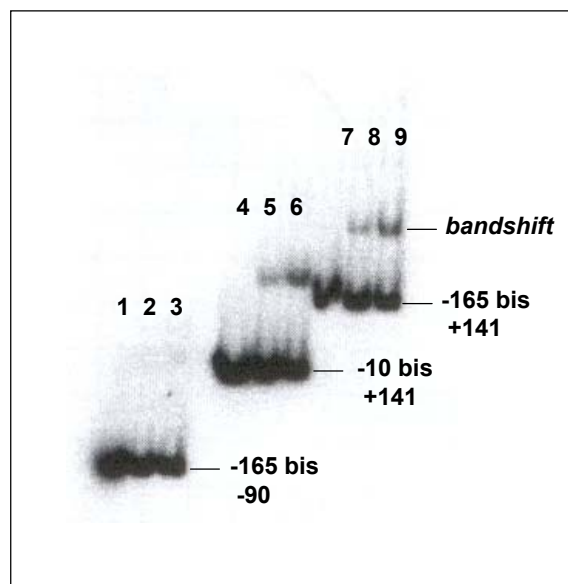


Abb. 4.31: Gelretardations-assay mit GST-NtrX-D52E und *puf*-Promotor-Fragmenten: Die Abbildung zeigt ein Bild eines *imaging screens*, auf dem ein Gel eines Gelretardations-assays exponiert wurde. GST-NtrX-D52E zeigt eine Bindung an zwei der dargestellten Fragmente der *puf*-Promotorregion. Nur die Fragmente, die den Bereich *downstream* des Transkriptionsstarts beinhalten werden von NtrX-D52E gebunden. **Spur 1-3:** *puf* –165 bis –10; **Spur 4-6:** *puf* –90 bis +165; **Spur 7-9:** *puf* –141 bis +165. Die **Spuren 1, 4 und 7** enthalten kein Protein; die **Spuren 2, 5 und 8** tragen je 1 µg NtrX-D52E und die **Spuren 3, 6 und 9** führen jeweils 2 µg NtrX-D52E im Ansatz.

4.2.2.7 Untersuchung des Laufverhaltens von GST-NtrX im nativen PAA-Gel

Da GST-NtrX mit 80 kD ein verhältnismäßig großes Protein ist, erscheint der Abstand von freier DNA zu an Protein gebundener DNA relativ gering. Bei einer solchen Molekülgröße würde man eine deutlichere Verlangsamung der DNA erwarten. Deshalb wurden die verschiedenen NtrX-Varianten nachfolgend in einer nativen Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, um ihr Laufverhalten in einem solchen Gel zu testen. Als Gelsystem wurden genau die Bedingungen gewählt, die üblicherweise für den Gelretardations-assay verwendet werden. Interessanterweise war zu erkennen, dass NtrX-D52E annähernd auf gleicher Höhe migriert, wie auch das DNA-Fragment *puf* –165 bis +141 (Abb. 4.32). Damit lässt sich der geringe Abstand von freier DNA zu gebundener DNA im Gelretardations-assay erklären.

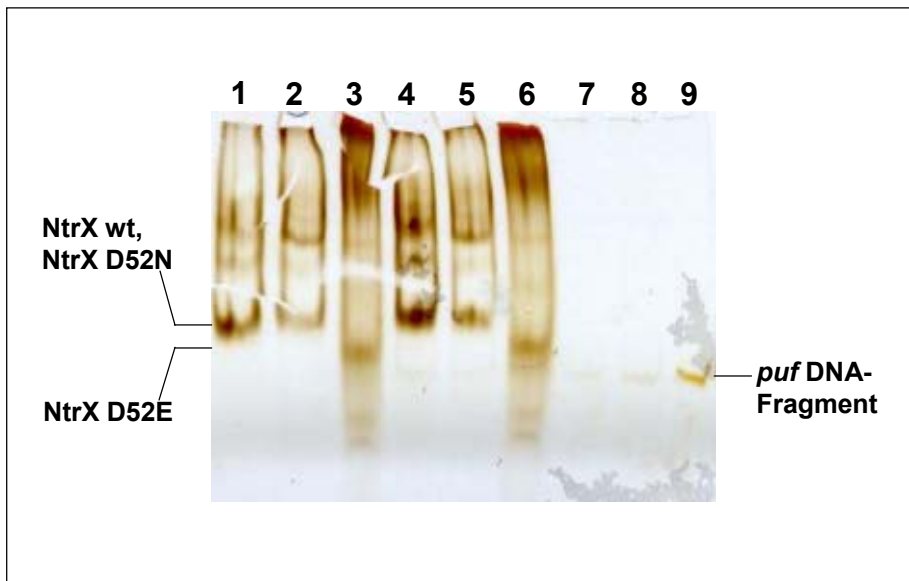


Abb. 4.32: Untersuchung des Laufverhaltens von GST-NtrX in einem nativen PAA-Gel: Die Abbildung zeigt ein 4 %-iges natives PAA-Gel, das nach der Elektrophorese mit Silbernitrat gefärbt wurde. Diese Färbung macht sowohl DNA als auch Proteine sichtbar. **Spur 1:** GST-NtrX-wt; **Spur 2:** GST-NtrX-D52N; **Spur 3:** GST-NtrX-D52E; **Spur 4:** GST-NtrX-wt + *puf*-DNA; **Spur 5:** GST-NtrX-D52N + *puf*-DNA; **Spur 6:** GST-NtrX-D52E + *puf*-DNA-Fragment; **Spur 7 bis 9:** *puf*-DNA Fragment mit zunehmender Konzentration (4 ng, 10 ng und 100 ng). Die Konzentration von 4 ng entspricht etwa der im Gelretardationsexperiment eingesetzten Konzentration. Das hier verwendete *puf*-DNA Fragment beinhaltet die Region *puf* –165 bis +141.

4.2.2.8 GST-pulldown-assay

Mit Hilfe des GST-*pulldown*-assays sollte ein weiterer Beweis der Interaktion von NtrX und RegA angetreten werden. In einer *in vitro* Transkriptions-Translations Reaktion wurde vom Plasmid pGAD-T7-*regA* ausgehend das mit ^{35}S -Methionin markierte RegA-Protein synthetisiert. Die Hälfte des Proteins dieser Reaktion wurde mit 50 μg GST-NtrX-wt zusammen mit Glutathion Sepharose inkubiert. Als Kontrolle diente die Glutathion-S-Transferase, die ebenfalls an Glutathion Sepharose gebunden und mit markiertem RegA-Protein inkubiert wurde. Nach der Reaktion wurden die Proben auf einem 15 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel nach dem Trocknen auf einem Röntgenfilm exponiert. Auf dem Röntgenfilm führte das radioaktivmarkierte RegA Protein zu einer Schwärzung. In Abbildung 4.33 ist das Ergebnis eines solchen Experiments dargestellt. Als Kontrolle der Translationsreaktion dienten 5 % des in die *pull-down*-Reaktionen eingesetzten *in vitro* translatierten RegA-Proteins. Hier war eine deutliche Schwärzung des Röntgenfilms erkennbar. Die

Reaktion, die GST mit RegA enthielt, zeigte nur ein schwaches Signal des markierten RegA Proteins, was auf ungenügendes Waschen der Glutathion-Sepharose zurückzuführen ist. Die Reaktion, in der GST-NtrX mit RegA zusammen inkubiert wurde, zeigte eine deutlich stärkere Präsenz des markierten RegA Proteins als in der GST-Kontrolle. Das an Glutathion-Sepharose gebundene NtrX interagiert schwach mit RegA, was zur Ko-Präzipitation beider Proteine führte. Aus diesem Grund enthielt der *pull-down-assay* mit GST-NtrX und RegA genügend RegA-Protein um eine deutliche Schwärzung des Röntgenfilms zu bewirken. Allerdings wurde nur ein sehr geringer Teil des eingesetzten *in vitro* translatierten RegA an GST-NtrX gebunden. Die Kontrolle, die nur 5 % des eingesetzten RegA enthält, zeigt eine deutlich stärkere Schwärzung als die Reaktion mit GST-NtrX und RegA.

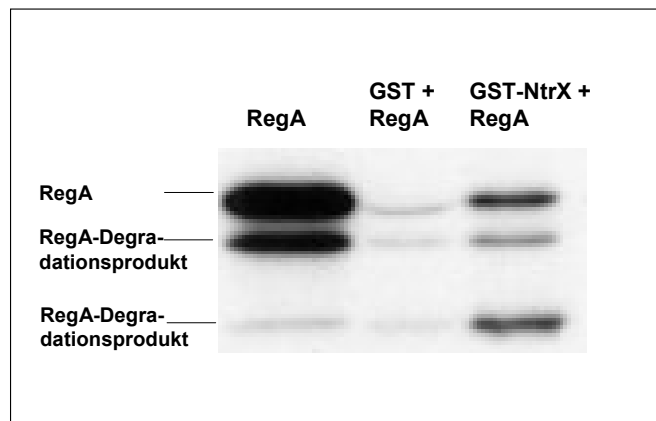


Abb. 4.33: GST-pulldown-assay zur Untersuchung der Interaktion von RegA und NtrX: Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines in einer SDS-PAGE aufgetrennten GST-pulldown-assays. Das radioaktivmarkierte RegA-Protein führt zur Schwärzung des Röntgenfilms. **Spur 1:** 5 % des in die *pull-down* Reaktion eingesetzten *in vitro* translatierten RegA Proteins. **Spur 2:** GST + RegA (Kontrolle), hier ist nur eine schwache Färbung des Films erkennbar. **Spur 3:** Hier wurde die Reaktion aufgetragen, in der GST-NtrX und RegA zusammen inkubiert wurden. RegA zeigt eine schwache Interaktion mit NtrX.

Zusätzlich zu der von radioaktivmarkiertem RegA erzeugten Bande waren zwei weitere Banden auf dem Röntgenfilm erkennbar. Diese stammen höchstwahrscheinlich von Abbauprodukten des RegA-Proteins. In dem Bereich des Gels, der den *pull-down-assay* von RegA und GST-NtrX zeigt, ist die Schwärzung des Röntgenfilms im Bereich der Bande des Degradationsproduktes ähnlich stark, wie die durch intaktes RegA verursachte Schwärzung. Dies könnte daran liegen, dass das *in vitro* translatierte und markierte RegA, das in der ersten Spur aufgetragen wurde, direkt nach der Translation

bis zum Gellauf bei -20°C gelagert wurde. Die *pull-down-assays* wurden allerdings im Zuge des Experiments längere Zeit bei Raumtemperatur inkubiert, was zu einer Anhäufung von Abbauprodukten führen könnte. Weiterhin ist es möglich, dass der degradierte Teil des RegA-Proteins eine stärkere Interaktion mit NtrX zeigte, als das gesamte Protein. Auch dann wäre es möglich, dass vermehrt Degradationsprodukte von RegA in der *pull-down*-Reaktion gefunden wurden.

4.2.3 2D-gelelektrophoretische Untersuchungen verschiedener *R. capsulatus* Stämme

NtrX scheint in *R. capsulatus* eine wichtige Rolle zu spielen. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1.2 bis 4.2.1.6 beschrieben, zeigen Stämme, die kein NtrX oder zuviel NtrX exprimieren, eine veränderte Zusammensetzung der Photosynthese-Komplexe. Weiterhin ist bei NtrX-Deletionsmutanten das Wachstum stark verlangsamt, die Konjugationsrate ist deutlich herabgesetzt und die Stämme neigen zur Bildung von Suppressormutationen um negative Auswirkungen zu kompensieren. Diese Vielzahl an Effekten ließ eine 2D-gelelektrophoretische Untersuchung der verschiedenen Stämmen als sinnvoll erscheinen, um somit Informationen über die Proteinzusammenstellung der einzelnen Mutanten zu erhalten. Für dieses Experiment wurden folgende *R. capsulatus* Stämme verwendet:

1. SB1003
2. SB1003 + pRK4*ntrX*
3. SB1003 Δ NtrX (mit eventuell vorhandenen Suppressormutationen)
4. Δ RC6
5. Δ RC6 Δ NtrX (mit eventuell vorhandenen Suppressormutationen)

Alle Kulturen wurden unter semiaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} von etwa 0,85 angezogen. Danach erfolgte die *in vivo* Markierung der Proteine mit ^{35}S -Methionin. Hierzu wurden 4 ml der Kultur in ein Reagenzglas überführt und mit 26 μCi ^{35}S -Methionin versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit wurden die Proben wie in Abschnitt 3.4.11 beschrieben weiterbehandelt und die Einbaurate für ^{35}S -Methionin bestimmt. Für die verwendeten Stämme lagen die Einbauraten zwischen 89 % und 92 %. Danach wurden die markierten Proteine in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die so erhaltenen PAA-Gele wurden einer Silberfärbung unterzogen.

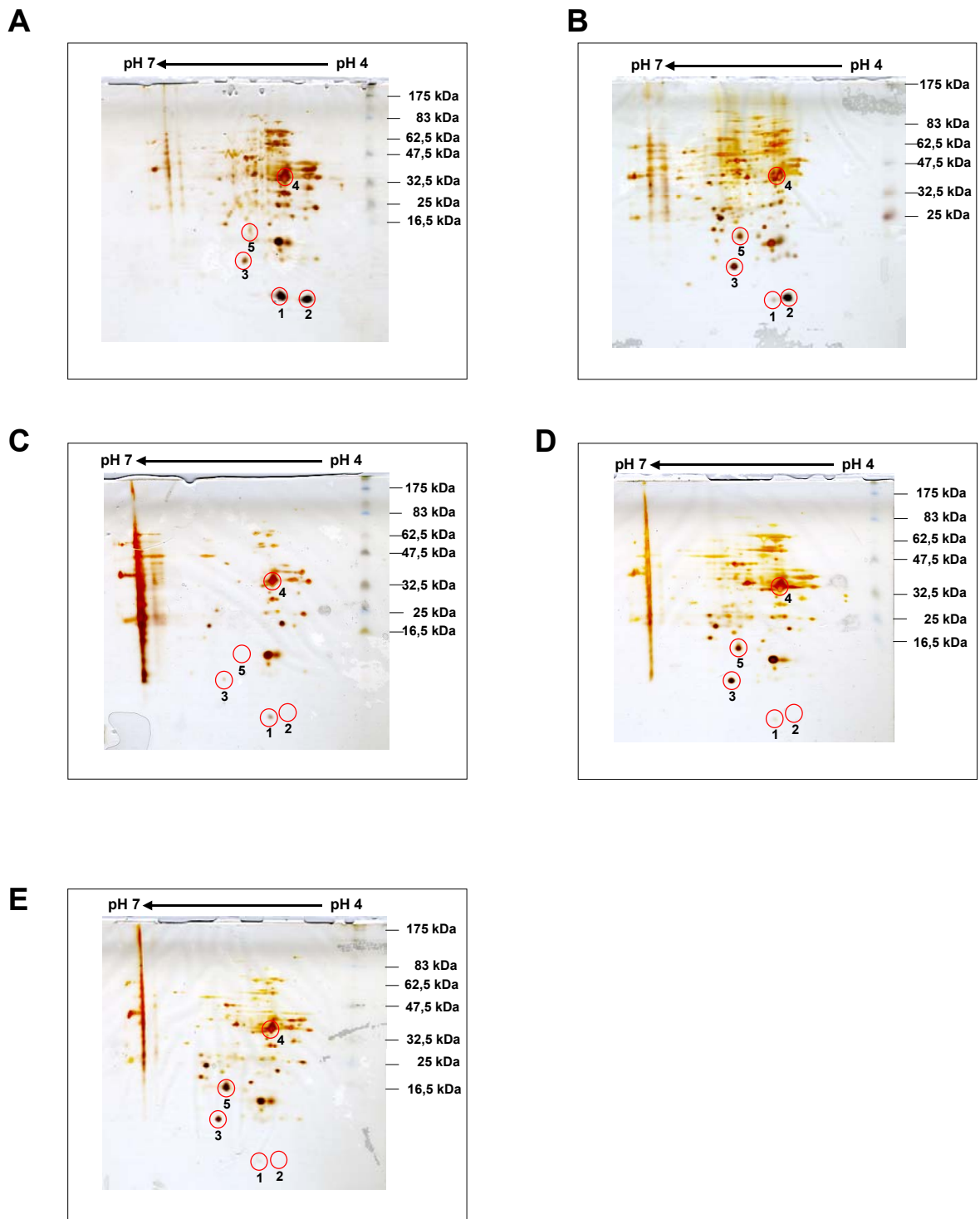


Abb. 4.34: 2D-gelelektrophoretische Untersuchung von verschiedenen *R. capsulatus* Stämmen: Die Bilder zeigen jeweils die Silberfärbung eines 10 %-igen Schägger-PAA-Gels nach Auftrennung der zweiten Dimension. Die rot eingekreisten Proteine werden im Text vergleichend diskutiert. **A:** SB1003; **B:** SB1003ΔNtrX; **C:** SB1003 + NtrX; **D:** ΔRC6; **E:** ΔRC6ΔNtrX

Zunächst wurden die Proteinmengen anhand der silbergefärbten Gele analysiert. Die innerhalb der Abbildung 4.34 rot eingekreisten Proteine zeigten eine unterschiedlich starke Expression in den einzelnen Kulturen. Insgesamt wurden fünf verschiedene Proteine für die vergleichende Analyse ausgewählt.

Die Proteine 1 und 2 wurden im Wildtypstamm *R. capsulatus* SB1003 verhältnismäßig stark exprimiert. Da die einzelnen Gele unterschiedliche Proteingesamtmenge tragen, ist eine Auswertung aus der Intensität einzelner Punkte nicht möglich. Zum Vergleich der Expressionsstärke sollte deshalb Protein 3 dienen. Die Menge von Protein 3 war im Wildtyp deutlich geringer als die der Proteine 1 und 2.

Wurde dagegen die *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX-Mutante betrachtet, so wurde deutlich, dass die Expression der Proteine 2 und 3 fast gleich stark war. Protein 1 hingegen zeigte eine herabgesetzte Menge im 2D-Gel.

Wurde nun das 2D-Gel der NtrX-überexprimierenden Mutante ausgewertet, so konnte man feststellen, dass hier das Protein 1 eine stärkere Präsenz als Protein 3 aufwies. Es war hingegen nicht möglich Protein 2 in diesem Experiment zu detektieren.

Interessanterweise wurden die Proteine 1 und 2 in den *R. capsulatus* Stämmen Δ RC6 und Δ RC6 Δ NtrX, verglichen mit Protein 3, fast gar nicht exprimiert. Es wäre also möglich, dass es sich bei den Proteinen 1 und 2 um Proteine des Photosyntheseapparates handelt, da *R. capsulatus* Δ RC6 ein Stamm ist, der eine Deletion innerhalb des *puf*-Operons hat, also nicht in der Lage ist, eine größere Menge an Photosynthese-Komplexen zu synthetisieren.

Wurden die Proteinmengen der Proteine 3 und 5 in den unterschiedlichen *R. capsulatus* Stämmen verglichen, so fiel auf, dass in den Stämmen *R. capsulatus* SB1003 und SB1003 + NtrX die Menge an Protein 3 höher war als die von Protein 5. In den beiden *R. capsulatus* Stämmen SB1003 Δ NtrX und Δ RC6 war die Menge der beiden Proteine 3 und 5 annähernd gleich, wohingegen im Stamm *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX die Menge an Protein 5 deutlich größer war, verglichen mit Protein 3. Das Protein 4 zeigte in allen fünf silbergefärbten 2D-Gelen eine ähnliche Menge. Allerdings wurden, bei Betrachtung der nachfolgenden Autoradiogramme, deutliche Unterschiede in der Menge an neusynthetisiertem Protein 4 in den verschiedenen Stämmen festgestellt.

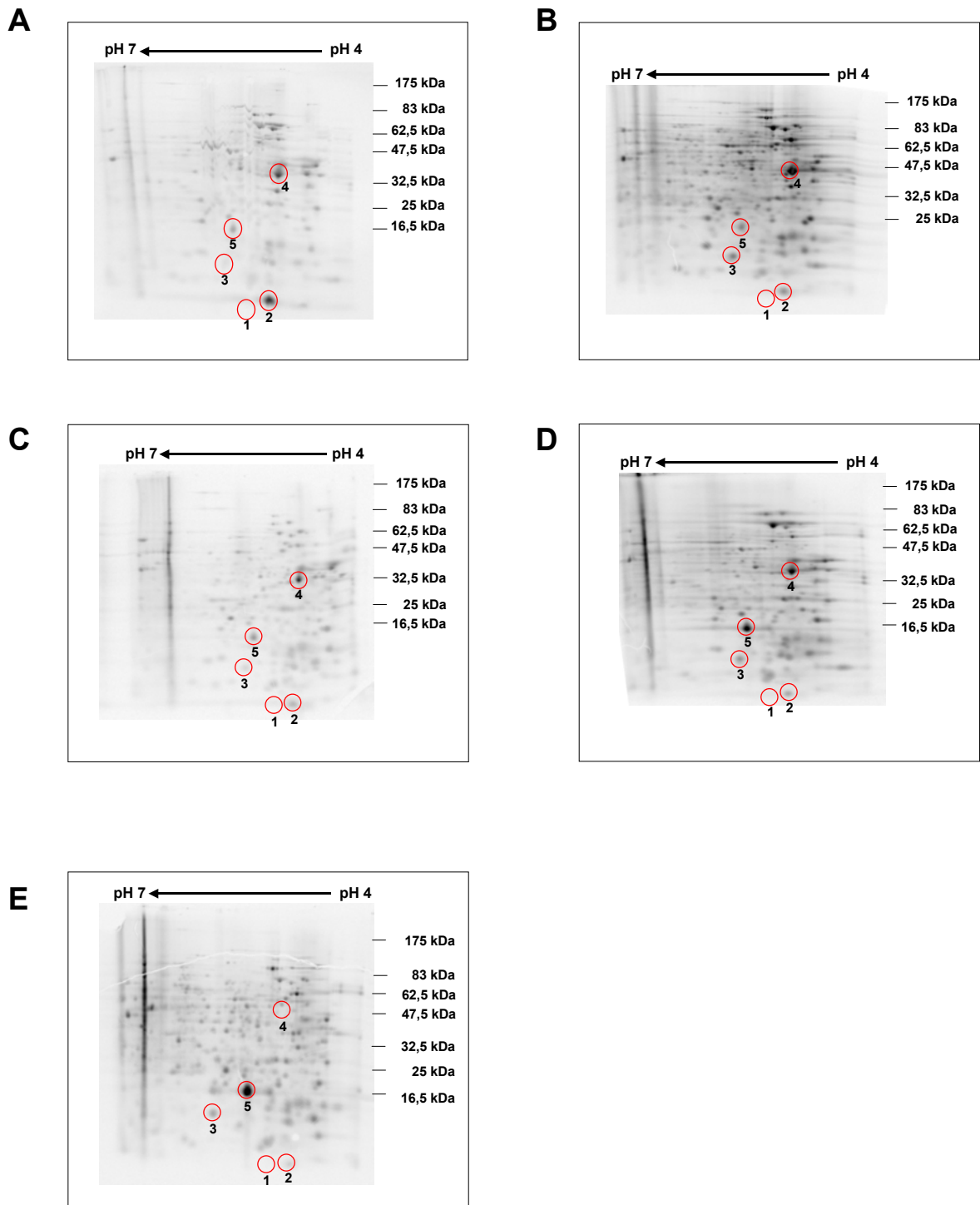


Abb. 4.35: Autoradiogramme von 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungen von *R. capsulatus* Stämmen: Die *in vivo* mit ^{35}S -Methionin markierten Proteine wurden auf einem 10 %-igen Schägger-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einem *imaging screen* exponiert. Die rot eingekreisten Proteine werden im Text vergleichend diskutiert. **A:** SB1003; **B:** SB1003 Δ NtrX; **C:** SB1003 + NtrX; **D:** Δ RC6; **E:** Δ RC6 Δ NtrX

Bei der Betrachtung der Autoradiogramme wurde deutlich, dass nicht alle der für die silbergefärbten Gele beschriebenen Proteine während der Markierung mit ^{35}S -Methionin synthetisiert wurden (Abb. 4.35). Beim Vergleich der Autoradiogramme ist es im Gegensatz zu den silbergefärbten Gelen möglich, anhand der Stärke eines einzelnen Signals Aussagen über die synthetisierte Proteinmenge zu machen, da in allen Experimenten die gleiche Menge an Gesamt-Radioaktivität aufgetragen wurde.

Im *R. capsulatus* Wildtyp SB1003 konnte beobachtet werden, dass Protein 2 eine starke Neusynthese aufwies, wobei Protein 1 und 3 nur schwach markiert wurden. Allerdings wurde hier noch ein weiteres Protein stark markiert, das Protein 4. Die Expression von Protein 4 ist im Wildtyp deutlich stärker als die von Protein 5.

Im Autoradiogramm der *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX-Mutante wies Protein 4 die stärkste Markierung auf. Auch in dieser Mutante dominiert die Markierung von Protein 2 über die von Protein 1. Weiterhin fiel auf, dass die Proteine 3 und 5 eine ähnlich starke Markierung zeigten.

Bei der Betrachtung des Autoradiogramms der NtrX-überexprimierenden Mutante wurde ein sehr ähnliches Bild festgestellt wie bei der *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX-Mutante. Bei der vergleichenden Untersuchung von Protein 5 und 3 fiel allerdings auf, dass Protein 5 im Gegensatz zu *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX etwas stärker markiert wurde als Protein 3. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit den Verhältnissen im Wildtypstamm.

Die *R. capsulatus* Δ RC6-Mutante zeigte im Autoradiogramm eine deutlich ausgeprägtere Markierung von Protein 5. In diesem Stamm wurde Protein 5 genauso stark markiert, wie Protein 4.

Betrachtet man abschließend die Δ RC6 Δ NtrX-Doppelmutante, so fiel auf, dass Protein 4 nicht detektierbar war, wohingegen Protein 5 sehr dominant markiert wurde. Weiterhin konnte Protein 5 im Autoradiogramm des Stamms *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX als stärkstes Protein detektiert werden.

Interessanterweise zeigten die Proteine 1 und 2 auf Ebene der Neusynthese kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen. Wurden die Gesamtproteine der Zellen allerdings miteinander verglichen, so konnten deutliche Veränderungen in Bezug auf die Expression der einzelnen Proteine festgestellt werden.

4.3 Interaktion von RegA mit AnfD und NifN

Eine weitere durch das 2-Hybridsystem identifizierte Interaktion war die von RegA mit der Untereinheit der alternativen Nitrogenase AnfD und dem Eisen-Molybdän-Cofaktor Biosynthese Protein NifN. AnfD und NifN weisen einen innerhalb aller nitrogenaseähnlichen Proteine homologen Bereich auf. In beiden Fällen trug dieser Bereich zur Interaktion mit RegA bei (vergleiche Abb. 4.7).

Eine Wechselwirkung von RegA mit der Nitrogenase erscheint sehr unwahrscheinlich, da die Nitrogenase unter Stickstoffmangel-Bedingungen etwa 40 % des Gesamtzellproteins ausmacht und von einem *response* Regulator wie RegA nur wenige Kopien pro Zelle vorliegen. Allerdings gibt es in *R. capsulatus* noch eine Reihe zur Nitrogenase homologe Proteine. Hierzu zählen unter anderem Proteine wie NifN, das an der Synthese der Nitrogenase beteiligt ist, aber auch die *dark-protochlorophyllid oxidoreductase* (DPOR), ein Enzym der Bakteriochlorophyll-Synthese (Fujita und Bauer, 2000). Die mit RegA interagierende Domäne von AnfD und NifN ist auch innerhalb der Sequenz des Bakteriochlorophyll-Synthese-Enzyms DPOR konserviert. Da eine Interaktion von RegA mit einem Enzym der Pigmentsynthese sehr viel wahrscheinlicher schien als eine Wechselwirkung mit der Nitrogenase, sollte der Bereich von DPOR, der den interagierenden Proteinen NifN und AnfD homolog ist, mit RegA im 2-Hybridsystem getestet werden. Dieser konservierte Teil des Proteins liegt innerhalb der BchB-Untereinheit der DPOR. Das *bchB*-Gen wurde deshalb in die Expressionsvektoren des Hefe 2-Hybridsystems kloniert und auf Interaktion mit RegA getestet. Zusätzlich wurden drei weitere Proteine, die eine Homologie zu AnfD und NifN aufweisen kloniert und deren Wechselwirkung mit RegA im 2-Hybridsystem untersucht.

4.3.1 Untersuchung von BchB im 2-Hybridsystem

4.3.1.1 Klonierung von BchB aus *Rhodobacter capsulatus*

Das *bchB* Gen aus *R. capsulatus* SB1003 wurde mittels PCR mit den primern *bchB*-84 und *bchB*-1890 von chromosomaler DNA amplifiziert. Über endständige Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xho*I wurde das 1806 bp große Fragment in den Vektor pGBK-T7 kloniert. Anschließend erfolgte eine Untersuchung im Hefe 2-Hybridsystem.

4.3.1.2 Untersuchung von BchB und RegA im Hefe 2-Hybridsystem

Nach der Koexpression von BchB und RegA in der Hefezelle kam es zu einer schwachen Interaktion der beiden Proteine verbunden mit einem vereinzelt Wachstum der Hefen auf den Selektionsplatten. Allerdings war die Wechselwirkung der beiden Proteine deutlich geringer (im β -Galaktosidase-*assay* nicht quantifizierbar) als bei den in der Genbank gefundenen Nitrogenase-Fragmenten (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass eine Interaktion des gesamten BchB mit RegA im Hefe 2-Hybridsystem schwer darstellbar ist. Deshalb sollte die Klonierung der N-terminalen Domäne aus BchB erfolgen. Innerhalb dieser Domäne befindet sich der zu AnfD und NifN homologe Bereich, der in diesen beiden Proteinen eine Interaktion mit RegA zeigte. Die Untersuchung der Interaktion von RegA und BchB sollte somit innerhalb der N-terminalen Aminosäuren 1 bis 307 des BchB-Proteins erfolgen.

4.3.1.3 Klonierung der N-terminalen Domäne aus BchB

Das BchB-Fragment aus *R. capsulatus* wurde in einer PCR mit den *primern* *bch*-140 und *bchB*-762 amplifiziert. Das 622 bp große DNA-Fragment wurde nach Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Cla*I in den Hefe-Expressionsvektor pGAD-T7 kloniert.

4.3.1.4 Untersuchung der Interaktion der BchB-Domäne mit RegA im 2-Hybridsystem

Nach der Koexpression von RegA und der BchB-Domäne innerhalb der Zellen *S. cerevisiae* AH109 konnte kein Wachstum auf Selektivagar festgestellt werden. Im 2-Hybridsystem konnte demnach keine Interaktion von RegA mit dem BchB-Protein oder dessen N-terminaler Domäne gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Untersuchung verschiedener Untereinheiten der Nitrogenase und nitrogenaseähnlicher Proteine im 2-Hybridsystem

Die Eisen-Molybdän-Nitrogenase besteht aus mehreren Untereinheiten. Sie setzt sich aus den drei Proteinen NifD, NifH und NifK zusammen. Auch die alternative Eisen-Eisen-Nitrogenase hat eine solche Struktur. In diesem Fall tragen die Proteine AnfD, AnfH und AnfK zum aktiven Nitrogenase-Enzym bei. Ein weiteres, bisher nicht genauer untersuchtes Operon im *R. capsulatus* Genom kodiert die Gene *nifH2* (RRC1294), *nifD2* (RRC1293) und *nifK2* (RRC1292). Die Benennung der Gene erfolgte auf Grund der Homologie zu den entsprechenden Genen der Eisen-Molybdän-Nitrogenase (Masepohl und Klipp, unveröffentlicht). Da sich die Untereinheiten der verschiedenen Nitrogenasen in ihrer Struktur ähneln

(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>), ist es möglich, dass sich eine für die Proteine NifN und AnfD gefundene Interaktion mit RegA auch auf andere Proteine dieser Gruppe übertragen lässt. Um zu überprüfen, ob es zu einer Interaktion von RegA und anderen nitrogenase-ähnlichen Proteinen bzw. Untereinheiten der Eisen-Molybdän-Nitrogenase kommen kann, wurden die Gene *nifD*, *nifH* und *nifH2* in die Expressionsvektoren des Hefe 2-Hybridsystems kloniert.

4.3.2.1 Klonierung der Gene aus *Rhodobacter capsulatus* für das 2-Hybridsystem

Für die weitere Untersuchung im 2-Hybridsystem wurden die Gene *nifD*, *nifH* und *nifH2* ausgewählt. Alle drei Gene wurden durch PCR mit chromosomaler DNA von *R. capsulatus* SB1003 amplifiziert. Für *nifD* wurden die *primer nifD*-187 und *nifD*-1826, für *nifH* die *primer nifH*-202 und *nifH*-1200 und für *nifH2* die *primer RRC1294*-195 und *RRC1294*-1085 verwendet. Anschließend wurde das 1639 bp *nifD*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Cla*I geschnitten und in den Vektor pGAD-T7 kloniert. Das 998 bp große *nifH*-Fragment wurde mit *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und ebenfalls in den Vektor pGAD-T7 ligiert. Das Amplifikat von *nifH2* war 890 bp groß und wurde über die *Eco*RI-Schnittstellen des Plasmids pGAD-T7 kloniert.

4.3.2.2 Untersuchung der Interaktion von Nitrogenase-Untereinheiten und nitrogenase-ähnlichen Proteinen mit RegA im 2-Hybridsystem

Bei der jeweiligen Koexpression der Proteine NifD, NifH bzw. NifH2 mit RegA innerhalb der Zellen von *S. cerevisiae* AH109 konnte kein Wachstum auf Selektivagar festgestellt werden. Es lag also keine messbare Interaktion dieser Proteine mit RegA vor (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden in diesem Fall lediglich die vollständigen Sequenzen der Gene kloniert. Es ist möglich, dass nur bestimmte Untereinheiten der Proteine für eine Interaktion benötigt werden, und dass diese im Gesamtprotein nicht zugänglich sind. Auch nach der Klonierung des gesamten *anfD*-Gens konnte bei Koexpression des vollständigen AnfD-Proteins mit RegA keine Interaktion im Hefe 2-Hybridsystem gefunden werden.

4.4 Untersuchung der Transkriptionsregulation des *puc*-Promotors in *E. coli*

4.4.1 Theorie

Durch die Untersuchungen im Hefe 2-Hybridsystem konnten Proteine identifiziert werden, die eine direkte Interaktion mit RegA zeigen. Allerdings ist es möglich, dass weitere Proteine mit RegA wechselwirken, dass für diese Wechselwirkung aber die Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen notwendig ist. Um auch solche Proteine zu identifizieren, sollte ein *in vivo* System innerhalb einer *E. coli* Zelle aufgebaut werden. *E. coli* MC4100 sollte durch die Transformation der entsprechenden Plasmide dazu gebracht werden, dass RegB/RegA Zweikomponentensystem zu exprimieren. Durch Untersuchungen von Chen *et al.* 2000 wurde gezeigt, dass die Sensorkinase RegB aus *R. capsulatus* in der *E. coli* Membran korrekt inseriert wird. Um die Aktivität des RegB/RegA-Zweikomponentensystems zu überprüfen wurde *E. coli* MC4100 mit einem Reporterplasmid transformiert, das eine *puc*-Promotor *lacZ*-Fusion trägt (pLH-II-Z-omega). Falls das Zweikomponentensystem aktiv ist, könnte so die Transkription des *puc*-Promotors aktiviert und die Expression der β -Galaktosidase eingeleitet werden. Aus Untersuchungen in *Agrobacterium tumefaciens* war bekannt, dass die α -Untereinheit der RNA-Polymerase (RpoA) in einem ähnlichen Experiment Einfluss auf die Aktivierung eines agrobakteriellen Promotors hatte (Lohrke *et al.*, 1999). Deshalb sollte diese Untereinheit des *R. capsulatus* Enzyms ebenfalls in *E. coli* MC4100 exprimiert werden. Um sicherzustellen, dass während der Untersuchungen aktives RegA vorhanden ist, sollte in einem zweiten Experiment die konstitutiv aktive Form RegA* in *E. coli* exprimiert werden

4.4.2 Klonierung

Für dieses Projekt wurden drei verschiedene Plasmide konstruiert: pRK4-*regA/regB*, pRK4-*regA** und pBBR-*rpoA*. pRK4-*regA/regB* entstand durch Restriktion der Plasmide pRK4-*regA* und pRK4-*regB* mit *Xba*I und *Kpn*I. Das 900 bp große *insert* aus pRK4-*regA* wurde nachfolgend in den Vektor pRK4-*regB* einkloniert. Das neu entstandene Plasmid pRK4-*regA/regB* war in der Lage, eine *R. capsulatus* RegA- und eine RegB-Deletionsmutante zu komplementieren. Diese Komplementation ist möglich, da das Ausgangsplasmid pRK415 einen IPTG-abhängig regulierten *lac*-Promotor trägt. Von diesem Promotor aus können die Gene auch in *E. coli* exprimiert werden. Das zweite zu konstruierende Plasmid war pRK4-*regA**. Das *regA**-Gen wurde durch PCR

mit den *primern* pGAD-T7-HA und *regA-end* aus dem Plasmid pGAD-T7-*regA**-lang amplifiziert. Anschließend wurde das 550 bp große Fragment über die endständigen Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *BamHI* in das Plasmid pRK415 kloniert. Es erwies sich als nicht möglich, mit Hilfe dieses Plasmids die *Rhodobacter* RegA- bzw. RegB-Mutanten zu komplementieren. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die zur Expression des Proteins notwendige Ribosomenbindungsstelle des *regA*-Gens fehlte. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde daher die *upstream* Sequenz des *regA*-Gens aus dem Plasmid pRK4-*regA* amplifiziert. Hierzu wurden die primer *regA-up* und *regA-start* verwendet. Dieses 200 bp große PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *HindIII* und *NdeI* in das Plasmid pRK4-*regA** einkloniert. Das so erhaltene erweiterte Plasmid pRK4-*regA** war nachfolgend in der Lage, eine *R. capsulatus* RegA- und eine RegB-Deletionsmutante zu komplementieren. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist beispielhaft in Abbildung 4.36 gezeigt.

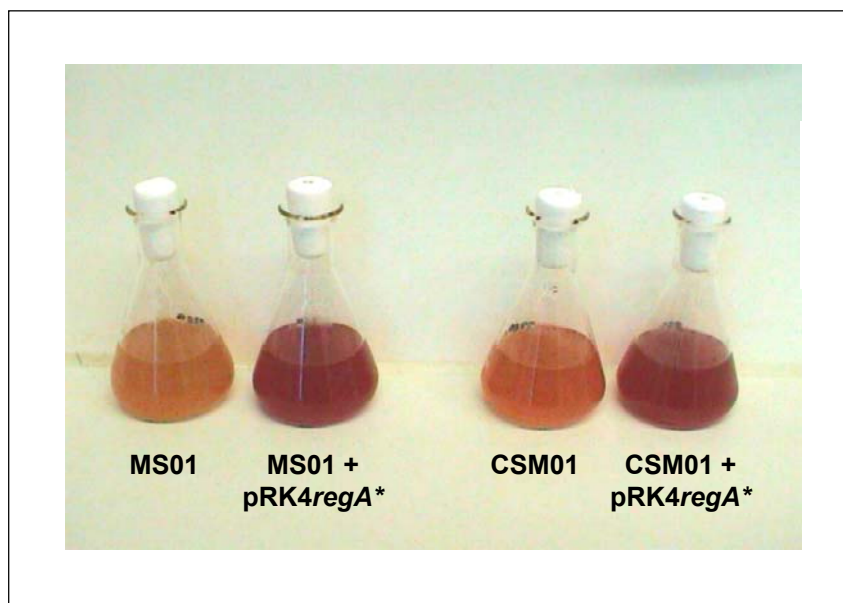


Abb. 4.36: Komplementation von *R. capsulatus* Mutanten: Von links nach rechts enthielten die Kolben semiaerobe Kulturen von *R. capsulatus* MS01 (RegA-Deletionsmutante), MS01 + pRK4-*regA**, CSM01 (RegB-Deletionsmutante), CSM01 + pRK4-*regA**. Es ist zu erkennen, dass die komplementierten Mutanten eine intensivere Färbung aufweisen, als die Ausgangsstämme MS01 und CSM01. Die Färbung kommt durch die Synthese von Pigment-Protein-Komplexen zustande. Durch Vergleich mit dem Wildtypstamm konnte festgestellt werden, dass die Komplementation erfolgreich war. Eine RegA- bzw. RegB-Mutante ist nicht in der Lage große Mengen an Photosynthese-Komplexen zu produzieren.

Für die Herstellung des Plasmids pBBR-*rpoA* wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt. Hierzu wurden die *primer rpoA-up* und *rpoA-down* verwendet, sowie chromosomale

DNA von *R. capsulatus* SB1003. Das entstandene 500 bp große PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI geschnitten und in das Plasmid pBBR1-MCS2 kloniert. Durch den auf dem Plasmid vorhandenen *lac*-Promotor sollte eine Expression von RpoA aus *R. capsulatus* in *E. coli* möglich sein.

4.4.3 *puc*-Promotor Aktivität

Die in Abschnitt 4.4.2 erwähnten Plasmide pRK4-*regA/regB*, pRK4-*regA** und pBBR-*rpoA* wurden zusammen mit den Plasmiden pLH-II-Z-omega, pRK4-*regA* und pRK4-*regB* in folgender Kombination in *E.coli* MC4100 eingebracht:

1. pLH-II-Z-omega
2. pLH-II-Z-omega + pBBR-*rpoA*
3. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regA*
4. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regA* + pBBR-*rpoA*
5. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regB*
6. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regB* + pBBR-*rpoA*
7. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regA/regB*
8. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regA/regB* + pBBR-*rpoA*
9. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regA**
10. pLH-II-Z-omega + pRK4-*regA** + pBBR-*rpoA*

Da sowohl die Gene der pRK415-Derivate als auch das *rpoA*-Gen unter der Kontrolle eines IPTG-abhängigen *lac*-Promotors stehen, wurden alle Kulturen einmal mit und einmal ohne Zugabe von IPTG angezogen. Alle Kulturen wurden einer Untersuchung zur β -Galaktosidase-Aktivität unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.37 dargestellt. Beim Vergleich der Werte von Kulturen mit und ohne IPTG zeigte sich, dass die Zugabe von IPTG keine deutliche Veränderung der β -Galaktosidase-Aktivität zur Folge hat (Daten nicht gezeigt). Die stets vorhandene Grundexpression führte bereits zu ausreichender Menge an regulatorischen Proteinen. Eine verstärkte Expression dieser Moleküle trug nicht mehr zu einer Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität bei. Zellen, die nur das Plasmid pLH-II-Z-omega trugen, wiesen eine β -Galaktosidase-Aktivität von etwa 6 Miller Einheiten auf. Die Werte für *E. coli*-Stämme mit den Plasmiden pRK4-*regA*, pRK4-*regB*, pBBR-*rpoA*, pRK4-*regA/regB* lagen bei etwa 3 bis 8 Miller Einheiten. Bei Zellen, die pRK4-*regA/regB* und die RpoA-Untereinheit der RNA-Polymerase trugen, lag die Aktivität bei durchschnittlich

11,5 Miller Einheiten. Wurde allerdings die konstitutiv aktive Form von RegA, das RegA*-Protein in den Stämmen exprimiert, so stieg die β -Galaktosidase-Aktivität auf Werte von 44 Miller Einheiten an. Wenn allerdings sowohl RegA* als auch RpoA in den Zellen vorhanden waren, so wurde nur eine Aktivität von 16 Miller Einheiten gemessen.

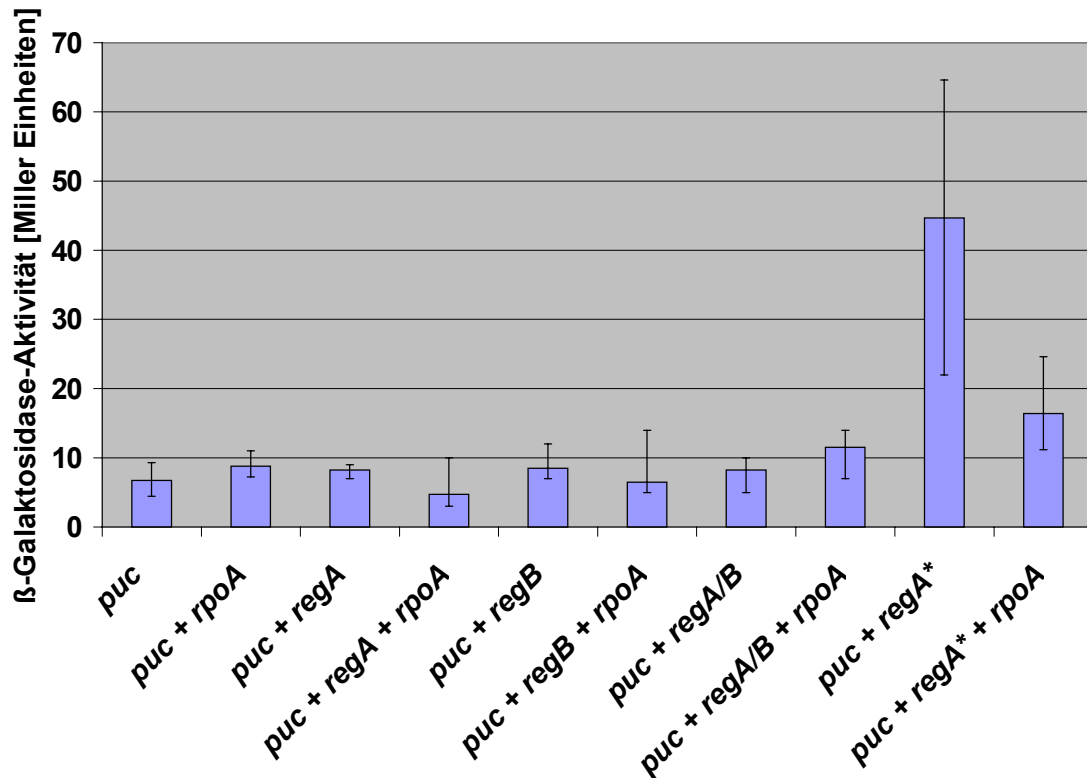


Abb. 4.37: β -Galaktosidase-Aktivität in verschiedenen *E. coli* MC4100 Kulturen: Alle *E. coli* Stämme enthalten das Reporterplasmid pLH-II-Z-omega (im Diagramm abgekürzt als *puc*). Des weiteren wurden RegA, RegB, RegA* oder RpoA in den Zellen exprimiert. Die Unterschiede in der β -Galaktosidase-Aktivität sind hier dargestellt. Es wurden jeweils die Werte aus drei bzw. sechs Messungen gemittelt und die größte Abweichung vom Mittelwert als Fehlerbalken angedeutet.

Bei der Messung der β -Galaktosidase-Aktivität in Stämmen, die die konstitutiv aktive Form von RegA zusammen mit dem Reporterplasmid trugen, zeigten sich zwar deutlich die höchsten β -Galaktosidase-Aktivitäten, allerdings schwankten die Werte sehr stark. Es wurden Aktivitäten von 22 bis 65 Miller Einheiten gemessen. Bevor dieses System zur Untersuchung der Transkriptionsregulation angewendet werden kann, sind noch weitere Messungen der β -Galaktosidase-Aktivität notwendig. Auch die Verwendung verschiedener Promotor-Reportergen-Fusionen wäre ein Ansatzpunkt um genauere Aussagen über die Funktionalität des Systems zu geben.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionspartner des *response* Regulators RegA aus *R. capsulatus* identifiziert werden. RegA ist im Gegensatz zu den meisten *response* Regulatoren bereits in unphosphoryliertem Zustand in der Lage an die Promotorregion von Zielgenen zu binden (Hemschemeier *et al.*, 2000). Da erst die Phosphorylierung von RegA zur spezifischen Regulation der jeweiligen Gene führt (Hemschemeier *et al.*, 2000), ist es denkbar, dass durch diese Phosphorylierung eine Konformationsänderung und damit eine Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht wird. Solche Interaktionspartner sollten mit Hilfe des Hefe 2-Hybridsystems identifiziert werden.

5.1 Untersuchung von RegA und RegA* im Hefe 2-Hybridsystem

Eine bereits vielfach eingesetzte Methode um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen bietet das Hefe 2-Hybridsystem (Übersicht in Tucker *et al.*, 2001). Das System weist gegenüber *in vitro* Untersuchungen eine Reihe von Vorteilen auf. Die zu untersuchenden Proteine müssen nicht aufgereinigt werden, sondern sie werden *in vivo* innerhalb einer Zelle synthetisiert und dort mit dem jeweiligen Interaktionspartner konfrontiert. Daher findet die Wechselwirkung der beiden Proteine in der Zelle und somit in möglichst natürlicher Umgebung statt. Allerdings ist es zur Untersuchung der Interaktion notwendig, die Proteine als Hybridproteine zu exprimieren. Die Fusion mit der GAL4-DNA-Bindedomäne bzw. der GAL4-Aktivator-domäne könnte zu einer veränderten Konformation der zu untersuchenden Proteine führen. Auch bakterienspezifische Modifikationen der Proteine können, da die Proteinsynthese in einer Hefezelle stattfindet, unter Umständen fehlen. Es ist ebenfalls möglich, die Protein-Protein-Interaktion in einer prokaryotischen Zelle zu testen (Karimova *et al.*, 1998; Übersicht in Hu *et al.*, 2000). In diesem Fall wären bakterienspezifische Modifikationen der Proteine gewährleistet. Allerdings könnte es in der Bakterienzelle auch andere, den zu untersuchenden Proteinen ähnliche Moleküle geben, die dann die Interaktionsstudie beeinflussen könnten. Deshalb wurde für diese Arbeit das Hefe 2-Hybridsystem anstelle von bakteriellen Systemen eingesetzt.

Ein weiterer Vorteil von 2-Hybridsystemen ist es, dass innerhalb einer begrenzten Zeitspanne das gesamte Genom eines Organismus nach Proteinen untersucht werden kann, die eine Interaktion mit dem gewünschten Protein aufweisen (Legrain und Selig, 2000). Da das Hefe 2-Hybridsystem neben eigentlichen Interaktionspartnern auch

sogenannte „falschpositive“ Protein-Wechselwirkungen liefert, müssen die jeweils gefundenen Interaktionen anschließend durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden.

5.1.1 Untersuchung der Interaktion von RegB mit RegA und RegA*

Unter Verwendung des Hefe 2-Hybridsystems konnte keine Interaktion von RegB und RegA festgestellt werden, wohl aber eine Interaktion von RegB und dem konstitutiv aktiven RegA*. Weiterhin ließ sich eine Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen des konstitutiv aktiven RegA* nachweisen. Auch eine Wechselwirkung zwischen RegA und RegA* konnte gezeigt werden. Eine Interaktion zweier RegA-Moleküle wurde nicht festgestellt.

RegA* hat, wie bereits anfangs erwähnt, einen Aminosäureaustausch innerhalb der Verbindungsregion zwischen Phosphorylierungs- und DNA-Bindedomäne (Du *et al.*, 1998). Auf Grund dessen verhält sich das Protein in einer *Rhodobacter* Zelle ähnlich, wie die phosphorylierte Form des *response* Regulators (Du *et al.*, 1998). Auch im Hefesystem scheinen sich die beiden Proteinvarianten RegA und RegA* unterschiedlich zu verhalten. Nur RegA* zeigt eine Interaktion mit RegB. Es erscheint also möglich, dass für die Interaktion von RegB und RegA innerhalb des Zweikomponentensystems eines der beiden Proteine phosphoryliert vorliegen muss. Auch *in vivo* findet eine Wechselwirkung zwischen RegB und RegA nur dann statt, wenn entweder RegB phosphoryliert ist und die Phosphatgruppe auf RegA überträgt, oder wenn RegA in phosphoryliertem Zustand vorliegt und RegB als RegA-spezifische Phosphatase wirkt (Bird *et al.*, 1999).

Die Stärke der Interaktion von RegA* und RegB wurde mittels β -Galaktosidase-*assay* auf etwa 33 % der internen Positivkontrolle (SV40 + p53) quantifiziert. Wenn die Interaktion von RegB und RegA tatsächlich abhängig von der Phosphorylierung eines der beiden Proteine ist, dann sollte eine Wechselwirkung im 2-Hybridsystem auch bei Verwendung einer konstitutiv aktiven Form von RegB nachweisbar sein. Es ist möglich, dass die Interaktion des phosphorylierten RegB-Proteins mit RegA sogar noch stärker ist als der umgekehrte Fall, da im Falle einer Autophosphorylierung von RegB eine schnelle Antwort auf das eingehende Signal erfolgen muss. Der Transfer des Phosphats auf RegA und die anschließende Aktivierung von Zielgenen muss möglichst schnell erfolgen, um eine rasche Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen zu erreichen. Sobald der *response* Regulator in phosphoryliertem Zustand vorliegt, verringert sich die

Affinität zur Sensorkinase. Dadurch wird das phosphorylierte Protein freigesetzt und kann an die Ziel-DNA binden. Die Dephosphorylierung des *response* Regulators ist ein Prozess, der weniger zeitlimitiert ist als die Phosphorylierung. Die Wechselwirkung von RegB und RegA* spiegeln die Bedingungen dieser Dephosphorylierung wider, da der *response* Regulator in konstitutiv aktiver Form vorliegt und die Sensorkinase unphosphoryliert ist.

Die Interaktion zweier konstitutiv aktiver RegA*-Moleküle deutet auf eine mögliche Dimerisierung des phosphorylierten RegA-Proteins hin. Bei vielen *response* Regulatoren kommt es nach der Phosphorylierung zu einer Dimerisierung zweier Regulator-Moleküle (Fiedler und Weiss, 1995; Da Re *et al.*, 1999). Dieses Dimer kann anschließend an die DNA binden und die transkriptionelle Regulation von Zielgenen bewirken. Wie bereits eingehend erwähnt, kann der *response* Regulator RegA auch in unphosphoryliertem Zustand an DNA binden, ist aber nicht zur Aktivierung der Transkription befähigt (Hemschemeier *et al.*, 2000). Es ist möglich, dass für die spezifische Transkriptionsregulation durch RegA eine Dimerisierung des *response* Regulators notwendig ist. Diese Dimerisierung kann nur in phosphoryliertem Zustand stattfinden. Zwei unphosphorylierte RegA-Moleküle zeigen dementsprechend auch keine Interaktion im Hefe 2-Hybridsystem.

Allerdings ist es möglich, dass RegA sowohl in phosphoryliertem als auch in unphosphoryliertem Zustand der Zelle eine Information darüber geben kann, welche Sauerstoff-Bedingungen in der Umgebung vorliegen. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ist RegA nicht phosphoryliert, wohingegen es nach Absenken des pO_2 zu einer Phosphorylierung des Proteins kommt. Es wäre denkbar, dass RegA je nach Phosphorylierungszustand mit spezifischen Proteinen interagieren und somit die Transkription verschiedener Gene beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurde im Verlauf dieser Arbeit mit beiden RegA-Varianten (RegA und RegA*) eine Suche nach Interaktionspartnern im Hefe 2-Hybridsystem durchgeführt.

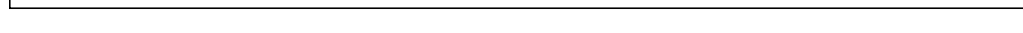
5.1.2 Identifizierung von Interaktionspartnern von RegA

Bei der Suche nach Interaktionspartnern des *response* Regulators RegA konnten insgesamt 40 Proteine identifiziert werden. 18 dieser Protein-Protein Interaktionen erwiesen sich als artifiziell, da das *insert* im Hefe-Expressionsvektor in falscher Orientierung eingebaut wurde. Diese Proteine wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Den übrigen Proteinen konnte anhand von Datenbankuntersuchungen eine putative oder aber experimentell nachgewiesene Funktion zugeordnet werden. Anhand dieser Funktion konnten die Proteine in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- Stickstoff-Fixierung: Dieser Gruppe gehören die Proteine AnfD, NifN und NtrX an. AnfD ist die α -Untereinheit der alternativen Eisen-Eisen-Nitrogenase in *R. capsulatus* (Schüddkopf *et al.*, 1993). NifN dient als Eisen-Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseprotein und ist somit an der Synthese der Eisen-Molybdän-Nitrogenase in *R. capsulatus* beteiligt (Moreno-Vivian *et al.*, 1989). NtrX ist der *response* Regulator des NtrY/NtrX-Zweikomponentensystems aus *R. capsulatus*. Über die Funktion dieses Zweikomponentensystems in *Rhodobacter* gibt es noch keine Daten. Für *Azorhizobium caulinodans* wurde beschrieben, dass das NtrY/NtrX-Zweikomponentensystem an der Regulation von Stickstoff-Fixierungsgenen beteiligt ist (Pawloski *et al.*, 1991).
- DNA-Reparatur: In dieser Gruppe werden die beiden Proteine RecA und die Nuklease-Untereinheit UvrC des Exzinuklease-Komplexes zusammengefasst. RecA ist an der DNA-Reparatur beteiligt, indem es einzelsträngige DNA bindet und diese an homologe doppelsträngige DNA-Bereiche annähert. Der einzelsträngige Bereich wird an den komplementären Strang angelagert und in diesem Sequenzabschnitt liegt somit ein Rekombinationsereignis vor (Knippers, 1997; pp 204-205). Die Exzisionsreparatur erfolgt durch Mitwirken mehrerer Proteinuntereinheiten (Exzinuklease-Komplex). Zuerst wird die DNA gebunden und nach Schäden untersucht. Die beschädigte Sequenz wird ausgeschnitten und die DNA-Polymerase füllt die einzelsträngige Lücke wieder auf (Knippers, 1997; pp 250-251).
- Sonstige: Hierzu gehören das eisenregulierte Protein FrpC und einige weitere Proteine mit zum Teil unbekannter Funktion.

Da das RegB/RegA-Zweikomponentensystem eine Rolle bei der Regulation von Stickstoff-Fixierungsgenen spielt (Elsen *et al.*, 2000), erscheint eine Interaktion mit einem Protein wie NtrX durchaus möglich. Für *A. caulinodans* wurde beschrieben, dass das NtrY/NtrX-Zweikomponentensystem an der transkriptionellen Regulation des Transkriptionsaktivators NifA beteiligt ist (Pawlowski *et al.*, 1991).



Zweikomponentensystem an der Regulation des gleichen Promotors beteiligt sind, wäre auch ein Wechselspiel zwischen den einzelnen Komponenten der Systeme denkbar. Allerdings wurde bisher noch keine solche Wechselwirkung zwischen zwei *response* Regulatormolekülen beschrieben.

Der im 2-Hybridsystem interagierende Teil von NtrX liegt im N-terminalen Bereich des Moleküls und beinhaltet die putative Phosphorylierungsstelle des Proteins (Abb. 4.8). Bei vielen *response* Regulatoren kommt es durch die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung im Molekül (Birk *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2001). Es wäre also denkbar, dass der im 2-Hybridsystem identifizierte Teil von NtrX in der unphosphorylierten Form des Proteins maskiert ist, und dass erst die Phosphorylierung des Moleküls eine Exposition dieses Bereichs bewirkt. Dies könnte erklären, warum im Hefe 2-Hybridsystem keine Interaktion von RegA und NtrX festzustellen war, wenn anstelle des im Genbankklon enthaltenen Fragments die gesamte Aminosäuresequenz von NtrX eingesetzt wurde.

Eine Interaktion von RegA mit einer Untereinheit der alternativen Nitrogenase erscheint dagegen weniger wahrscheinlich. Generell stellt die Nitrogenase unter Induktionsbedingungen, das heißt, unter anaeroben Bedingungen bei Stickstoffmangel, bis zu 40 % des Gesamtzellproteins, wohingegen RegA als *response* Regulator nur in wenigen Kopien innerhalb der Zelle vorliegen sollte. Ein Informationsaustausch zwischen diesen beiden Proteinen ist daher unwahrscheinlich.

Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuresequenz von AnfD und NifN fällt auf, dass beide Proteine eine Oxidoreduktase-Domäne beinhalten und in ihrer Sequenz zu 31 % homolog sind (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>). Der im Hefeklon enthaltene Teil der beiden Proteine überlappt in einem Bereich von 67 Aminosäuren innerhalb dieser Oxidoreduktase-Domäne (siehe Abb. 4.7). Es wäre also denkbar, dass dieser Bereich der Proteine, der auch in anderen Oxidoreduktasen homolog ist, für die Interaktion mit RegA wichtig ist. Daher wurden sowohl die Proteine NifN und AnfD, als auch der *response* Regulator NtrX zur genaueren Untersuchung weiterverwendet.

Eine Interaktion von RegA mit Proteinen der DNA-Reparatur erscheint eher unwahrscheinlich. Es ist möglich, dass es während der Photosynthese, wo Sonnenlicht zur Energiebereitstellung genutzt wird, auch zu verstärkter Aufnahme von UV-Strahlung und somit zur DNA-Schädigung kommt. Allerdings ist die Ausbildung der Photosynthese-Komplexe nicht maßgeblich abhängig von Licht und die Zellen können auch unter aeroben Bedingungen Licht ausgesetzt sein, das ihre DNA-Struktur

beeinflusst. Deshalb wurde von einer weiteren Untersuchung dieser in die DNA-Reparatur involvierten Proteine abgesehen.

Auch die in der Gruppe „Sonstige“ zusammengefassten Proteine wurden keiner genaueren Untersuchung unterzogen. Das eisenregulierte Protein FrpC wurde beispielsweise in einer parallel verlaufenden 2-Hybridsystem-Analyse von Proteinen gefunden, die eine Interaktion mit Thioredoxin aufweisen (Haberzettl, unveröffentlicht). Da FrpC im Hefe 2-Hybridsystem als spezifischer Interaktionspartner von Thioredoxin und von RegA identifiziert wurde, liegt einerseits die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein Protein handelt, das innerhalb des Hefe 2-Hybridsystems vermehrt Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. Andererseits ist Thioredoxin wie auch RegA an der Regulation von Photosynthesegenen in *Rhodobacter* beteiligt (Pasternak *et al.*, 1999). Daher wäre auch eine spezifische Interaktion von RegA und Thioredoxin mit FrpC denkbar. Allerdings wurden diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen vorgenommen.

5.1.3 Identifizierung von Interaktionspartnern von RegA*

Insgesamt konnten 25 Proteine identifiziert werden, die eine Interaktion mit RegA* im Hefe 2-Hybridsystem zeigten. Allerdings erwies sich nach Sequenzierung der jeweiligen *inserts* aus den Hefe-Expressionsvektoren die überwiegende Anzahl der Proteine als artifiziell. Nur vier der Hefe-Expressionsplasmide enthielten ein *insert*, dessen Orientierung der im Genom von *Rhodobacter* entsprach. Die hier identifizierten Proteine konnten nach ihrer putativen Funktion in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- Stickstoff-Fixierung: In diese Gruppe gehören die Proteine NtrY und das Stickstoff-Fixierungs-Aktivatorprotein RRC 149. NtrY ist die Sensorkinase des NtrY/NtrX-Zweikomponentensystems. Für *Rhodobacter* gibt es keinerlei Hinweise über die mögliche Funktion des Systems. Wie bereits oben erwähnt, wurde dieses Zweikomponentensystem bereits in *A. caulinodans* beschrieben und ist in diesem Bakterium an der Regulation von Stickstoff-Fixierungsgenen beteiligt (Pawlowski *et al.*, 1991). Das Protein RRC 149 ähnelt einem Stickstoff-Fixierungs-Aktivatorprotein aus *Synechocystis spec.* Weitere Informationen über das Protein liegen derzeit nicht vor.
- Sonstige: Hier finden sich die beiden hypothetischen Proteine RRC 2756 und RRC 2443. Bei RRC 2443 handelt es sich möglicherweise um ein

membranassoziiertes Protein. Weitere Aussagen zu diesen beiden Proteinen können zum jetzigen Zeitpunkt nicht gemacht werden.

Auch bei der Suche nach Interaktionspartnern des konstitutiv aktiven RegA* konnten zwei Proteine identifiziert werden, die eine mögliche Rolle innerhalb der Stickstoff-Fixierung oder deren Regulation spielen. Besonders auffallend ist die Interaktion mit der putativen membrangebundenen Sensorkinase NtrY, da bereits der zugehörige *response* Regulator NtrX eine Interaktion mit RegA zeigte. Es wäre also möglich, dass es zwischen den beiden Zweikomponentensystemen RegB/RegA und NtrY/NtrX zu einem sogenannten *crosstalk* kommt, das heißt, die beiden Systeme könnten miteinander kommunizieren. Die hier gezeigten Ergebnisse der Interaktion von NtrY und RegA* könnten ein Hinweis auf ein *phosphorelay*-System sein. Es wurde bereits eine Reihe solcher *phosphorelay*-Systeme innerhalb der prokaryotischen Signaltransduktion beschrieben (Übersicht in Appleby *et al.*, 1996). Es wäre denkbar, dass NtrY in der Lage ist, RegA~P zu dephosphorylieren. Andererseits wäre es auch möglich, dass NtrY die Information des phosphorylierten RegA, also den niedrigen Sauerstoffpartialdruck, anhand der Phosphorylierung wahrnimmt und an andere Komponenten, z. B. NtrX, weiterleitet.

Nach genaueren Untersuchungen der Interaktion von NtrY und RegA* konnte allerdings keine spezifische Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen festgestellt werden. NtrY interagiert ebenso mit der GAL4-Bindedomäne als auch mit dem Kontroll-Protein LaminC. Trotz dieser Resultate kann eine Interaktion von NtrY und RegA* nicht ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass NtrY sowohl mit der GAL4-Bindedomäne als auch mit RegA* eine Wechselwirkung eingeht. Da im Hefe 2-Hybridsystem aber keine Trennung dieser beiden Komponenten möglich ist, ist für eine genauere Untersuchung der Interaktion die Verwendung einer anderen Methode notwendig.

Auch die Interaktion von RegA* mit dem Stickstoff-Fixierungs-Aktivatorprotein RRC 149 erwies sich als unspezifisch, da auch hier eine Wechselwirkung mit GAL4-Bindedomäne und LaminC zu beobachten war. Für die beiden hypothetischen Proteine RRC 2756 und RRC 2443 wurden keine weiteren Untersuchungen vorgenommen.

5.2 Interaktion von RegA mit dem *response* Regulator NtrX

Da über die Funktion von NtrX in *R. capsulatus* kaum Informationen zur Verfügung standen, wurde eine Charakterisierung des Proteins *in vivo* und *in vitro* angestrebt. Im

Chromosom von *R. capsulatus* ist das NtrY/NtrX-Zweikomponentensystem unmittelbar *downstream* des NtrB/NtrC-Zweikomponentensystems lokalisiert (<http://wit.mcs.anl.gov/WIT2>). Das NtrB/NtrC-System ist in verschiedenen Bakterien maßgeblich an der Regulation der Stickstoff-Fixierungsgene in Abhängigkeit der Ammoniumverfügbarkeit beteiligt (Austin *et al.*, 1987; Jones und Haselkorn, 1989). Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Zweikomponentensysteme im Chromosom und auch wegen der Ähnlichkeit der beiden *response* Regulatoren NtrC und NtrX zueinander (Pawlowski *et al.*, 1991), liegt die Vermutung nahe, dass beide Systeme in ähnlicher Weise in die Regulation von Zielgenen involviert sind.

5.2.1 Charakterisierung von NtrX *in vivo*

Zur Charakterisierung von NtrX *in vivo* wurde das *ntrX*-Gen im Genom von *R. capsulatus* durch Einsetzen einer Resistenzkassette deletiert. Die so erhaltenen Mutanten zeigten eine Reihe von phänotypischen Veränderungen verglichen mit dem Wildtypstamm SB1003. Die NtrX-Deletionsmutante *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX zeigte stark verlangsamtes Wachstum und war im Vergleich zum Wildtyp nur beschränkt in der Lage, Plasmide durch eine Konjugation aufzunehmen. NtrX scheint also in der *Rhodobacter* Zelle eine wichtige Funktion zu haben, da der Verlust des Proteins solche drastischen Auswirkungen auf die Bakterien hat.

Weitere Unterschiede zwischen NtrX-Deletionsmutante und Wildtyp konnten bei der Betrachtung von Absorptionsspektren festgestellt werden. Interessanterweise waren diese beobachteten Effekte abhängig vom Ammoniumgehalt des verwendeten Mediums. Eine phototroph gewachsene *R. capsulatus* SB1003ΔNtrX-Kultur zeigte bei gleicher optischer Dichte eine größere Menge an Photosynthese-(PS)-Komplexen als der Wildtyp.

Für die Untersuchung der *R. capsulatus* Stämme bei verschiedenen Stickstoffkonzentrationen wurden im RÄ-Medium 0 mM, 2,5 mM, 7,6 mM und 18 mM Ammonium zugesetzt. Bei 2,5 mM Ammonium ist die vorhandene Stickstoffmenge wachstumslimitierend und die Zellen beginnen mit der verstärkten Expression der Nitrogenasegene (Hübner *et al.*, 1993). Unter anaeroben Bedingungen können die Zellen anschließend zur Fixierung von molekularem Stickstoff übergehen.

Wurde Medium ohne Ammonium-Zusatz verwendet, so war die Menge an Photosynthese-Komplexen um etwa 20 % erhöht. Bei einem Ammoniumgehalt von 2,5 mM im Medium wurden sogar 70 – 80 % mehr PS-Komplexe gemessen. Wurden

noch höhere Konzentrationen an Ammonium zugesetzt, so verschob sich das Verhältnis der beiden *peaks* bei 803 nm (LH-II / RC) und bei 860 nm (LH-I / LH-II) zueinander. Der *peak* LH-II / RC war bei der NtrX-Mutante kleiner als im Wildtyp, wohingegen der *peak* LH-I / LH-II deutlich größer war. Gleichzeitig konnte eine Verschiebung des LH-II / RC *peaks* von 803 zu 800 nm beobachtet werden. Bei 803 nm findet man eine charakteristische Nebenabsorption des Reaktionszentrums von *R. capsulatus*. LH-II alleine würde bewirken, dass dieser *peak* ein Absorptionsmaximum von etwa 800 nm hätte. Auch die deutlich reduzierte Gesamtfläche dieses *peaks* deutet darauf hin, dass die Deletionsmutante weniger Reaktionszentren produziert und es dadurch zur Verschiebung des LH-II / RC *peaks* zu kürzerer Wellenlänge kommt. Interessanterweise scheint dieser Effekt abhängig vom Ammoniumgehalt des Mediums zu sein. Erst wenn die Ammoniumkonzentration im Medium höher als 7,6 mM ist, kommt es zur Veränderung im Verhältnis der beiden PS-*peaks* zueinander und zu einer Verschiebung des kürzerwelligen Absorptionsmaximums.

Bereits vor einigen Jahren wurde eine Verbindung der Regulation von Photosynthesegenen und Stickstoff-Fixierungsgenen in *R. capsulatus* beschrieben (Kern *et al.*, 1997). *Rhodobacter*-Kulturen, die Stickstoff-Fixierung betrieben, wiesen deutlich höhere Mengen an PS-Komplexen auf als in ammoniumhaltigem Medium gewachsene Zellen von *R. capsulatus*. Stickstoff-Fixierung ist ein äußerst energieaufwendiger Prozess (Ludden und Roberts, 1995). Deshalb wäre es denkbar, dass die Bakterien zur Bereitstellung dieser Energie mehr PS-Komplexe herstellen, um mehr Lichtenergie zu verarbeiten.

Die Deletion des *ntrX*-Gens in *R. capsulatus* führte zur erhöhten Menge an PS-Komplexen. Je mehr Ammonium im Medium enthalten war, desto größer wurde die Diskrepanz in der Menge an PS-Komplexen zwischen Wildtyp und NtrX-Mutante. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass NtrX als Repressor von Photosynthesegenen bei hohen Ammoniumkonzentrationen fungieren könnte. Liegt der Ammoniumgehalt im Medium unter 2,5 mM, so kommt es zur verstärkten Synthese der Nitrogenase in *R. capsulatus* (Hübner *et al.*, 1993). Unter diesen Bedingungen werden auch mehr PS-Komplexe benötigt und die durch NtrX bewirkte Repression wird abgeschwächt.

Zur genaueren Untersuchung, ob NtrX als Repressor von Photosynthesegenen wirken kann, wurde das Protein in *R. capsulatus* SB1003 überexprimiert. Die so generierten Stämme zeigten eine um 30 % herabgesetzte Menge an PS-Komplexen verglichen mit

dem Wildtypstamm. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beleg dafür, dass NtrX reprimierend auf die Regulation der Synthese von PS-Komplexen wirken kann.

Nach einiger Zeit konnte bei den NtrX-Deletionsmutanten eine Wachstumsrate beobachtet werden, die vergleichbar mit der des Wildtypstammes war. Gleichmaßen zeigten diese Stämme nun eine herabgesetzte Menge an PS-Komplexen verglichen mit dem Wildtyp. Um zu prüfen, ob die Menge an PS-Komplexen der Zellen durch Suppressor-Mutationen vermindert wurde, wurde eine Komplementation dieses Stammes mit einer plasmidkodierten Kopie des *ntrX*-Gens versucht. Diese Zellen zeigten im Vergleich zum Ausgangsstamm eine herabgesetzte Menge an PS-Komplexen. Wenn also die geringere Menge an PS-Komplexen auf die Deletion des *ntrX*-Gens zurückzuführen wäre, so sollte durch Einbringen des Gens die Wildtypsituation wiederhergestellt werden. Wird das Gen allerdings auf dem Plasmid pRK4-*ntrX* bereitgestellt, so sinkt die Menge an PS-Komplexen noch weiter ab. Da das Plasmid pRK4-*ntrX* in nur wenigen Kopien innerhalb der Zelle vorliegt (Keen *et al.*, 1988), ist es eher unwahrscheinlich, dass die Menge an NtrX durch Einbringen des Plasmids so drastisch erhöht wurde, dass bereits eine Überexpression des Proteins vorlag. Daher ist anzunehmen, dass der Ausgangsstamm bereits eine oder mehrere Mutationen enthält, die für die Verringerung der Menge an PS-Komplexen verantwortlich sind.

Ein ähnliches Phänomen wurde in *Rhodobacter* Zellen beobachtet, die eine verstärkte Expression des *puf*-Operons aufwiesen (Klug und Jock, 1991). In dieser Studie wurden Punktmutationen im Bereich der *puf*-Promotorregion vorgenommen, die eine stärkere Transkription des *puf*-Operons bewirkten. Die so generierten Stämme zeigten ein stark verlangsamtes Wachstum und wurden nach einiger Zeit von Suppressormutanten überwachsen (Klug und Jock, 1991).

Die vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass NtrX als negativer Regulator der PS-Genexpression wirken kann. Daher wäre es möglich, dass es bei einer Deletion von *ntrX* zu einer verstärkten Expression des *puf*-Operons kommt und somit ebenfalls zu einer Selektion von Suppressormutanten, die den negativen Effekt dieser Überexpression kompensieren können.

Um diese Möglichkeit zu prüfen wurde eine Deletion von *ntrX* in einem Stamm vorgenommen, der kein *puf*-Operon besitzt und somit nur in geringem Maße in der Lage ist, PS-Komplexe zu synthetisieren. Die so generierte Mutante *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX zeigte, ebenso wie *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX, eine größere Menge an

PS-Komplexen als der Ausgangsstamm. Da der Ausgangsstamm *R. capsulatus* Δ RC6 selbst nur geringfügige Mengen an PS-Komplexen synthetisieren kann, war der Effekt nicht so deutlich, wie bei der im Wildtyp generierten NtrX-Mutante. Die negative Regulation von PS-Genen beschränkt sich also nicht nur auf die vom *puf*-Operon kodierten Gene, sondern auch die Menge des vom *puc*-Operon kodierten LH-II ist von der *ntrX*-Deletion betroffen. Um zu prüfen, ob der *puf*-Promotor in der *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX-Mutante anders reguliert wird als im Ausgangsstamm Δ RC6, wurden plasmidkodierte *puf*-Promotor-*lacZ*-Fusionen in beide Stämme eingebracht und die β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen wurde bestimmt. Hierbei zeigten die *R. capsulatus* Δ RC6 Δ NtrX-Mutanten eine höhere Aktivität als der Ausgangsstamm. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die Transkription des *puc*- als auch die des *puf*-Operons durch die Deletion von *ntrX* im Stamm *R. capsulatus* Δ RC6 beeinflusst wurde.

Allerdings erwiesen sich auch die Δ RC6 Δ NtrX-Mutanten als genetisch instabil. Es scheint neben der verstärkten Synthese von Photosynthese-Komplexen noch weitere wichtige Prozesse zu geben, bei denen NtrX eine maßgebliche Rolle spielt.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Δ RC6 Δ NtrX-Mutante sprechen ebenfalls dafür, dass NtrX als Repressor der Synthese von PS-Komplexen in *R. capsulatus* fungiert. Es ist möglich, dass auch der Stamm *R. capsulatus* SB1003 Δ NtrX, der eine stark erhöhte Menge an PS-Komplexen aufwies, bereits eine Suppressormutation enthielt. Allerdings wurde auch bei der Deletion von *ntrX* im Stamm *R. capsulatus* Δ RC6 anfangs eine erhöhte PS-Komplex Menge festgestellt. In beiden Deletionsmutanten kam es erst in späteren Generationen zur Herabsetzung der Menge an PS-Komplexen. Da also in zwei unterschiedlichen Stämmen nach einer Deletion von *ntrX* zu Beginn eine größere Menge an PS-Komplexen zu beobachten war, scheint dieser Effekt eher auf das fehlende *ntrX*-Gen als auf eine Suppressormutation zurückzuführen zu sein. Ein weiterer Beleg hierfür ist die Überexpression von NtrX in *R. capsulatus*. Diese Stämme zeigten eine um 30 % verminderte Menge an PS-Komplexen. Dieses Phänomen führt im Einklang mit den obigen Ergebnissen zu dem Schluss, dass NtrX einen negativ regulatorischen Effekt auf die Synthese von PS-Komplexen ausübt.

5.2.2 Charakterisierung der Interaktion von NtrX und RegA *in vitro*

Wie bereits oben angesprochen, werden im Hefe 2-Hybridsystem nicht ausschließlich physiologisch relevante Protein-Protein-Interaktionen beobachtet. Daher ist es

notwendig, eine im Hefesystem identifizierte Wechselwirkung zweier Proteine zusätzlich durch eine zweite Methode nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde ein GST-*pull-down-assay* durchgeführt. Dafür wurde NtrX als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) als *affinity tag* in *E. coli* exprimiert. Eine Untersuchung von GST-NtrX und *in vitro* translatiertem RegA im GST-*pull-down-assay* konnte eine Interaktion der beiden Proteine verifizieren. Die Wechselwirkung von RegA und NtrX konnte also sowohl im Hefe 2-Hybridsystem als auch in einem GST-*pull-down-assay* nachgewiesen werden.

Bei Charakterisierung der NtrX-Deletionsmutanten von *R. capsulatus* wurde deutlich, dass NtrX einen Einfluss auf die Synthese des Photosyntheseapparates hat. Da NtrX ein *response* Regulator ist (Pawlowski *et al.*, 1991) und eine putative DNA-Bindedomäne besitzt (Abb. 4.8), wurden Gelretardationsexperimente mit den Promotorregionen des *puf*- und des *puc*-Operons durchgeführt. Eine Bindung von NtrX an die Promotorregionen der beiden PS-Operons konnte nicht festgestellt werden. Allerdings binden einige *response* Regulatoren nur in phosphoryliertem Zustand an ihre Ziel-DNA (Galinier *et al.*, 1994). Es besteht daher die Möglichkeit, dass auch NtrX um eine spezifische Wechselwirkung mit der DNA eingehen zu können, phosphoryliert sein muss. Für einige *response* Regulatoren wurde beschrieben, dass es möglich ist, die Proteine durch Zugabe von Acetylphosphat zu einer Autophosphorylierung zu veranlassen (Feng *et al.*, 1992). Auch für NtrC, ein zu NtrX homologes Protein, wurde eine solche Reaktion beschrieben (Chen und Reitzer, 1995). NtrC ist wie bereits erwähnt der *response* Regulator des NtrB/NtrC-Zweikomponentensystems, das an der transkriptionellen Regulation der Stickstoff-Fixierungsgene in *R. capsulatus* beteiligt ist (Foster-Hartnett und Kranz, 1992). Auf Grund der Homologie zwischen NtrC und NtrX (Pawlowski *et al.*, 1991) sollte getestet werden, ob auch NtrX *in vitro* mit Acetylphosphat phosphoryliert werden kann. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurde NtrX in Gelretardationsexperimenten mit der Promotorregion des *puf*- und des *puc*-Operons getestet. Allerdings zeigte sich auch hier keine Bindung von NtrX an die angebotene DNA. Da für die Phosphorylierungsreaktion nicht-radioaktives Acetylphosphat verwendet wurde, fehlt der direkte Nachweis, dass die Phosphorylierung an sich erfolgreich war. Daher wurde eine Mutagenese von NtrX durchgeführt, bei der durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren die Aktivität des Proteins beeinflusst werden sollte. Für NtrC wurde beschrieben, dass durch Austausch des Aspartat 54, welches die Phosphorylierungsstelle des Moleküls darstellt

(Klose *et al.*, 1993), durch andere Aminosäuren, eine geänderte DNA-Bindungs-fähigkeit des Proteins erreicht wird (Klose *et al.*, 1993). So führt beispielsweise der Austausch von Aspartat zu Glutamat (D54E) zu einer konstitutiv aktiven Variante von NtrC, wohingegen ein Austausch von Aspartat zu Asparagin (D54N) eine Inaktivierung des Proteins bewirkt (Klose *et al.*, 1993). Deshalb wurde auch für NtrX die putative Phosphorylierungsstelle Aspartat 52 zu Asparagin (D52N) und zu Glutamat (D52E) getauscht.

Bereits bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus *E. coli* konnte ein Unterschied von NtrX-D52N und NtrX-D52E festgestellt werden. Die Expression von NtrX-D52N konnte wie auch die des Wildtyp-Proteins (NtrX-wt) bei einer Temperatur von 32°C induziert werden. Auch bei der Aufreinigung verhielt sich NtrX-D52N genau wie NtrX-wt. Für D52E musste eine geringere Temperatur zur Induktion eingehalten werden. Gleichzeitig war die Proteinausbeute bei der Aufreinigung von NtrX-D52E deutlich geringer als bei den anderen beiden NtrX-Varianten. Es scheint also für *E. coli* verglichen mit NtrX-wt schwieriger zu sein, NtrX-D52E zu exprimieren.

Wurden nun die drei NtrX-Varianten NtrX-wt, NtrX-D52N und NtrX-D52E auf die Bindung an die Promotorregion des *puf*- und des *puc*-Operons hin untersucht, so zeigte auch hier die Variante NtrX-D52N wie auch das Wildtypprotein keine Interaktion mit den angebotenen DNA-Fragmenten. NtrX-D52E dagegen konnte an die Promotorregion des *puf*-Operons binden, allerdings nur dann, wenn das Fragment den Bereich *downstream* des Transkriptionsstarts enthielt. Fragmente, die nur den Bereich *upstream* des Transkriptionsstarts trugen, wurden nicht gebunden. Durch die Mutagenese von NtrX konnte demnach festgestellt werden, dass das Protein nur in einer, den phosphorylierten Zustand widerspiegelnden, Konformation in der Lage ist, die Promotorregion des *puf*-Operons zu binden. Gleichzeitig konnte der DNA-Bereich, der für die Bindung von NtrX benötigt wird, *downstream* des Transkriptionsstarts des *puf*-Operons lokalisiert werden.

Betrachtet man vergleichsweise die Bindung von NtrC an dessen Ziel-DNA, so wird deutlich, dass dieses Protein ein *enhancer* Bindeprotein ist (Reitzer und Magasanik, 1986). NtrC bindet im Bereich einer *enhancer* Region, die, wie bei eukaryotischen *enhancern*, sowohl *upstream* als auch *downstream* des Transkriptionsstarts des regulierten Gens liegen kann (Reitzer und Magasanik, 1986). Innerhalb dieser Region binden zwei NtrC-Dimere. Diese vier phosphorylierten NtrC-Moleküle bilden dann ein NtrC~P-Oligomer, das durch Bildung einer DNA-Schleife einen direkten Kontakt mit

der σ^{54} -RNA-Polymerase herstellt. Durch Hydrolyse von ATP bewirkt NtrC eine Konformationsänderung innerhalb des σ^{54} -Holoenzym, die dann zur Bildung eines offenen Transkriptionskomplexes führt (Übersicht über die Funktion von NtrC in Porter *et al.*, 1995).

Da NtrC und NtrX strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind (Pawlowski *et al.*, 1991), wäre es denkbar, dass auch NtrX in der Lage ist durch Bindung einer *downstream* des Transkriptionsstarts gelegenen Sequenz eine Regulation des entsprechenden Gens zu bewirken. Wie NtrC ist auch NtrX nur in der konstitutiv aktiven Form (D52E), die die phosphorylierte Konformation der Proteine widerspiegeln sollte, fähig, an DNA zu binden. Eine DNA-Bindungssequenz, die der von NtrC ähnelt, konnte im Bereich der NtrX-Bindungsstelle nicht identifiziert werden.

5.2.3 2D-gelelektrophoretische Untersuchung verschiedener *R. capsulatus* Stämme

Bereits bei der Charakterisierung der NtrX-Deletionsmutanten fiel auf, dass das Fehlen des *ntrX*-Gens eine Reihe von Veränderungen innerhalb der Zellen bewirkte. Daher sollten nachfolgend 2D-gelelektrophoretische Untersuchungen vorgenommen werden. Hierbei konnten die Gesamtprotein-Muster unterschiedlicher Stämme miteinander verglichen werden. Die Zellen wurden für das Experiment unter semiaeroben Bedingungen kultiviert, um eine Synthese der photosynthetischen Komplexe zu bewirken.

Nach der Elektrophorese wurden die silbergefärbten Gele miteinander verglichen. Hierbei fiel auf, dass zwei im Wildtyp sehr prominente Proteine innerhalb der verschiedenen NtrX-Mutanten unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen. Die beiden Proteine 1 und 2 sind mit einem Molekulargewicht von weniger als 16 kD recht klein. Der isoelektrische Punkt der Proteine liegt etwa bei pH 5, also eher im sauren Bereich. Da die Proteine im Wildtyp eine sehr starke Präsenz aufweisen, wäre es möglich, dass es sich um Proteine des Photosyntheseapparates handelt. Im Photosyntheseapparat von *R. capsulatus* gibt es vier verschiedene Strukturproteine, die ein Molekulargewicht von 5 kD bzw. 6 kD haben. Zwei davon, PufB und PucB, weisen einen hypothetischen isoelektrischen Punkt von 4,8 bzw. 4,9 auf. Die beiden 6 kD großen Proteine PufA und PucA haben einen hypothetischen isoelektrischen Punkt, der bei etwa 10, also im basischen pH-Bereich, liegt.

Interessanterweise sind diese beiden Proteine in der Δ RC6-Mutante, also der Mutante ohne *puf*-Operon, nur sehr schwach vorhanden. Da diese Mutante nur in geringem Maße fähig ist, PS-Komplexe herzustellen (Chen *et al.*, 1988), wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die beiden Proteine 1 und 2 eine Bedeutung innerhalb des Photosyntheseapparates haben. Auch in der Δ RC6 Δ NtrX-Mutante sind beide Proteine im Vergleich zum *R. capsulatus* Wildtypstamm deutlich reduziert. Da die Δ RC6-Mutante kein LH-I und kein Reaktionszentrum (RC) herstellen kann, können die, wenn auch nur in geringer Menge vorhandenen, Proteine 1 und 2 nur vom LH-II stammen.

Die SB1003 Δ NtrX-Mutante zeigt eine starke Präsenz des Proteins 2, wohingegen das Protein 1 kaum zu erkennen ist. Genau entgegengesetzt verhält sich die NtrX überexprimierende Mutante. Bei der Untersuchung dieses Stamms fällt auf, dass Protein 2 praktisch nicht erkennbar ist, während Protein 1 eine deutliche Präsenz aufweist. Dieses alternierende Verhalten der einerseits NtrX überexprimierenden und andererseits der NtrX-Deletionsmutante weist auf eine Rolle von NtrX bei der spezifischen Anreicherung dieser beiden Proteine hin.

Eigentlich wäre in der NtrX-Deletionsmutante eine stark vermehrte Expression von Proteinen des Photosyntheseapparates zu erwarten gewesen. Allerdings wurden die 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungen mit einem Stamm von SB1003 Δ NtrX durchgeführt, der höchstwahrscheinlich bereits durch Suppressormutationen verändert war. Daher ist es möglich, dass diese Zellen bereits durch anderweitige Mutationen für eine verminderte Expression dieser Proteine sorgten. Ein weiterer Hinweis, dass die Proteine 1 und 2 eine Rolle im Photosyntheseapparat spielen, beruht darauf, dass in 2D-Gelen von aeroben Kulturen des Wildtyps *R. capsulatus* B10 beide Proteine nicht vorhanden waren (Jäger, unveröffentlicht).

Bei der Betrachtung der Autoradiogramme der jeweiligen 2D-Gele wurde festgestellt, dass das Protein 1 in allen Stämmen nicht visualisiert werden konnte. Da die *in vivo* Markierung der Proteine mit radioaktivmarkiertem Methionin durchgeführt wurde, ist es möglich, dass dieses Protein deshalb nicht stärker markiert wurde, weil es zu wenig Methionin enthält. Bei sehr kleinen Proteinen besteht die Gefahr, dass lediglich das Startcodon ein Methionin ist und dass daher eine deutliche Markierung nicht stattfinden kann. Die bereits vorher beschriebenen kleinen Proteine des Photosyntheseapparates weisen alle nur ein oder zwei Methionin-Reste innerhalb ihrer Sequenz auf. Es ist weiterhin möglich, dass das Protein 1 zwar eine starke Präsenz aufweist, aber zum Zeitpunkt der *in vivo* Markierung der Proteine nicht synthetisiert wurde. Das Protein 2

hingegen zeigt im Wildtyp eine starke Markierung, die ähnlich wie bei dem silbergefärbten Gel deutlich gegenüber den anderen Proteine hervortritt.

Protein 4, das auch auf den silbergefärbten Gelen eine starke Präsenz in allen Stämmen zeigte, wies diese, mit Ausnahme des Stammes $\Delta\text{RC6}\Delta\text{NtrX}$, auch in den Autoradiogrammen auf. In allen übrigen Stämmen wurde Protein 4 als stärkstes oder zweitstärkstes Signal im Autoradiogramm detektiert, wohingegen es im Stamm $\Delta\text{RC6}\Delta\text{NtrX}$ nicht nachweisbar war. Da im Bereich von Protein 4 im silbergefärbten Gel eine ganze Reihe von Proteinen sichtbar sind, ist nicht klar, ob das Protein 4 wirklich in allen fünf Stämmen mit ähnlicher Präsenz vorhanden ist. Da allerdings in sämtlichen Stämmen im Bereich des Proteins 4 im silbergefärbten Gel ein sehr prominentes Protein auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich sowohl im Gel als auch im Autoradiogramm um dasselbe Protein handelt.

Protein 5 weist sowohl im Gel als auch im Autoradiogramm eine unterschiedlich starke Präsenz in den verschiedenen Stämmen auf. Im Wildtyp und in der NtrX überexprimierenden Mutante ist Protein 5 im Gel deutlich schwächer gefärbt als das als Referenz-Protein verwendete Protein 3. In den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 ΔNtrX und ΔRC6 ist die Menge von Protein 5 vergleichbar mit der von Protein 3, wohingegen in der $\Delta\text{RC6}\Delta\text{NtrX}$ -Doppelmutante sogar deutlich mehr Protein 5 vorhanden ist. Bei Betrachtung der Autoradiogramme fällt ebenfalls auf, dass das Protein 5 in der $\Delta\text{RC6}\Delta\text{NtrX}$ -Mutante die stärkste Markierung aufweist. Es scheint also, als wäre die Menge an Protein 5 abhängig davon, ob der Stamm entweder eine Deletion des *puf*-Operons, oder aber des *ntrX*-Gens aufweist. Eine Deletion von *ntrX* führt zu einer erhöhten Menge von Protein 5, ebenso eine Deletion des *puf*-Operons. Werden beide Deletionen in ein und demselben Stamm vorgenommen, so addieren sich die Effekte und es kommt zu einer weiteren Steigerung der Expression von Protein 5. Es muss sich also um zwei unabhängige Phänomene handeln, da ansonsten eine Deletion von *ntrX* und *puf*-Operon keine weitere Steigerung des Effekts, also der Expression von Protein 5 bewirken dürfte. Allerdings führen beide Deletionen zum selben Resultat, die Expression des Proteins 5 wird gesteigert.

Da zur Zeit noch keine Sequenzierung der einzelnen Proteine vorgenommen wurde, können über deren Funktionen lediglich Vermutungen angestellt werden. Anhand der Ergebnisse der 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungen der verschiedenen *R. capsulatus* NtrX-Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass sich die Deletion bzw. die Überexpression von NtrX deutlich auf die Proteinmuster der einzelnen Stämme

auswirkte. Daher ist die Schlussfolgerung möglich, dass NtrX tatsächlich einen Einfluss auf die Regulation verschiedener Proteine in *R. capsulatus* hat. Die verschiedenen Expressionsmuster der Proteine 1 und 2 geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass es sich um Proteine des Photosyntheseapparates handeln könnte.

5.2.4 Modell für die Interaktion von NtrX und RegA

Alle experimentell gesammelten Daten zur Charakterisierung der Interaktion von NtrX und RegA in *R. capsulatus* wurden zu folgendem Modell über die Wirkungsweise von NtrX zusammengefasst (Abb. 5.2): Auf Grund der Absorptionsspektren der Deletionsmutanten, kann der Schluss gezogen werden, dass NtrX an der ammoniumabhängigen Regulation der Photosynthesegene in *R. capsulatus* beteiligt ist (vgl. Abschnitt 4.2.1.2). Diese Gene scheinen bei hohen Ammoniumkonzentrationen von NtrX reprimiert zu werden. Auch unter Stickstoffmangelbedingungen kommt es zu einer jedoch geringeren Repression der Photosynthesegene.

NtrX bindet nur in phosphorylierter Form an die *downstream* Sequenz der *puf*-Promotorregion (vgl. Abschnitt 4.2.2.6). *Upstream* des Transkriptionsstarts des *puf*-Operons befinden sich Bindungsstellen für RegA und den *integration host factor* (IHF) (Kirndörfer *et al.*, 1998). Bereits am Beispiel des *nifA*-Promotors aus *Herbaspirillum seropedicae* konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von IHF die Krümmung der DNA bewirken kann. Diese Krümmung führt im Falle dieses *nifA*-Promotors zu einer DNA-Schleife, die den direkten Kontakt von NtrC und σ^{54} -RNA-Polymerase ermöglicht (Wassem *et al.*, 2000).

Sollte das Bindungsverhalten von NtrX ähnlich dem von NtrC sein, so wäre es denkbar, dass NtrX die *puf*-Promotorregion bindet und IHF für eine Faltung der DNA sorgt. Durch diese DNA-Schleife könnte es dann zum direkten Kontakt zwischen NtrX und unphosphoryliertem RegA (vgl. Abschnitt 4.1.3.2.1) kommen, da RegA, wie bereits mehrfach erwähnt, auch in unphosphoryliertem Zustand in der Lage ist, DNA zu binden (Hemschemeier *et al.*, 2000) (Abb. 5.2-2a). Auf Grund dieser Schleifenbildung ist die Expression des *puf*-Operons reprimiert. Die Transkription kann nicht stattfinden, da der Transkriptionsstart von dem RegA/NtrX-Komplex blockiert wird. Kommt es zur Phosphorylierung von RegA, so verringert sich die Affinität von NtrX zu RegA (vgl. Abschnitt 4.1.3.2.1) und die Interaktion wird unterbrochen. Trotzdem verbleibt NtrX auf der DNA und verhindert so in geringem Maße noch die Transkription (Abb. 5.2-2b). Allerdings wäre es denkbar, dass nach Verlust der Interaktion mit RegA auch die

Affinität von NtrX für die DNA geringer wird. Die Phosphorylierung von RegA könnte weiterhin eine Veränderung der DNA-Krümmungsaktivität von IHF bewirken. Daher kommt es in dieser Situation nicht zur Bildung einer DNA-Schleife.

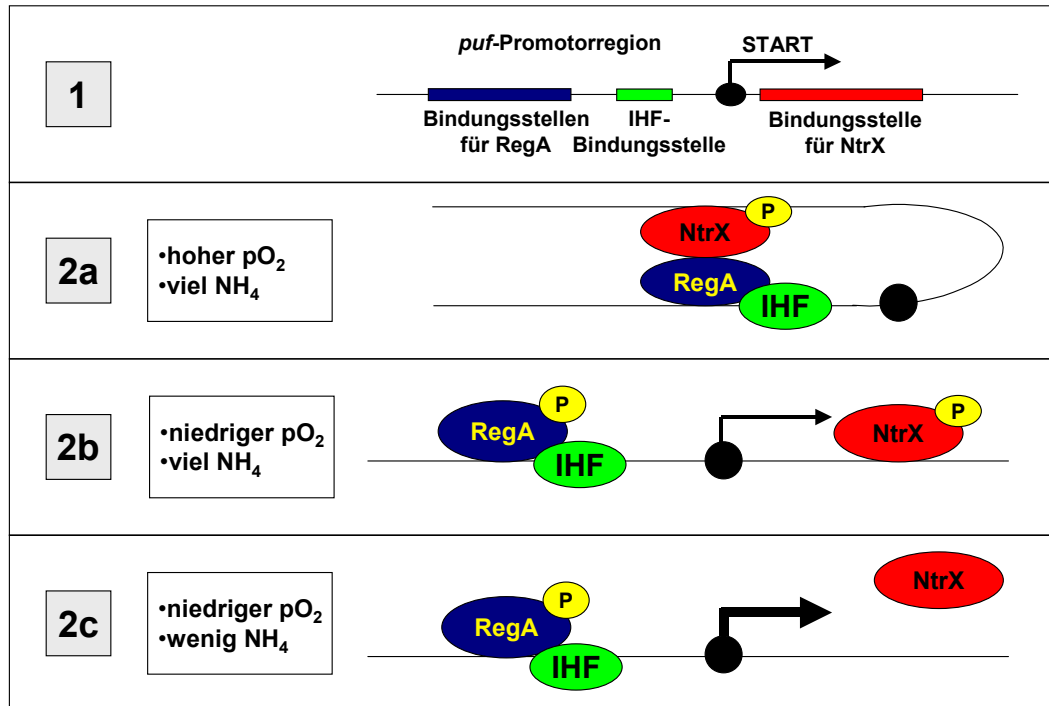


Abb. 5.2: Modell für die Regulation von Photosynthesegenen durch NtrX und RegA:
1: Darstellung der *puf*-Promotorregion, eingezeichnet sind in blau die Bindungsstelle für RegA, in grün die Bindungsstelle für IHF und in rot die Bindungsstelle für NtrX. Durch START wird die Lage des Transkriptionsstarts angedeutet. **2a:** Bei hohem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und ausreichender Stickstoff-Versorgung (NH_4) binden unphosphoryliertes RegA, IHF und phosphoryliertes NtrX an die jeweiligen Bindungsstellen. IHF bewirkt eine DNA-Krümmung, daher kann es zur Interaktion von RegA und NtrX~P kommen. **2b:** Fällt der pO_2 unter ein bestimmtes Niveau wird RegA phosphoryliert und ersetzt das unphosphorylierte Protein an der DNA. Die Interaktion von RegA~P und NtrX~P ist nur sehr schwach. Die Phosphorylierung von RegA beeinflusst auch die DNA-Krümmungsaktivität von IHF, daher kommt es in dieser Situation nicht zur Bildung einer DNA-Schleife. NtrX~P bindet noch an die DNA, aber die Expression des *puf*-Operons ist durch dieses Protein nur noch schwach reprimiert. **2c:** Fällt nun auch der Ammoniumgehalt (NH_4) in der Umgebung unter einen Schwellenwert, so wird NtrX nicht mehr phosphoryliert und verlässt die DNA. Die Transkription des *puf*-Operons kann nun ebenfalls unter Mitwirken von IHF in noch stärkerem Maße vorstatten gehen.

Liegt NtrX nun unter Stickstoffmangelbedingungen dephosphoryliert vor, verliert es die Fähigkeit DNA zu binden und die Transkription des *puf*-Operons kann vorstatten gehen (Abb. 5.2-2c). IHF könnte dann eventuell durch die erneute Bildung einer DNA-Schleife aktivierend auf die Transkription des *puf*-Operons wirken. Mit Hilfe dieses Modells kann erklärt werden, wie es zu einer verstärkten Synthese von PS-Komplexen bei stickstoff-fixierenden Kulturen von *R. capsulatus* (Kern *et al.*, 1998) kommt. Die

einerseits aktivierende andererseits reprimierende Wirkungsweise von IHF wurde am Beispiel des *nifA*-Promotors in *H. seropedicae* beschrieben (Wassem *et al.*, 2000).

5.3 Interaktion von RegA mit AnfD und NifN

Im Hefe 2-Hybridsystem wurde eine Interaktion von RegA mit AnfD und mit NifN gefunden. Die Interaktion mit AnfD erwies sich als relativ schwach, wohingegen die Wechselwirkung von RegA und NifN deutlich stärker war, als die Interaktion zwischen RegB und RegA*. AnfD ist die α -Untereinheit der alternativen Eisen-Eisen-Nitrogenase in *R. capsulatus* (Schüddekopf *et al.*, 1993). NifN fungiert als Eisen-Molybdän-Cofaktor Biosyntheseprotein, es ist also an der Synthese der Eisen-Molybdän-Nitrogenase in *Rhodobacter* beteiligt (Moreno-Vivian *et al.*, 1989). *R. capsulatus* besitzt zwei verschiedene Nitrogenasen, die Eisen-Molybdän-(Fe-Mo)-Nitrogenase und die Eisen-Eisen-(Fe-Fe)-Nitrogenase (Schneider *et al.*, 1991). Unter Stickstoffmangel-Bedingungen wird die Expression der Eisen-Molybdän-Nitrogenase induziert (Übersicht in Kranz und Cullen, 1995). Liegt zusätzlich auch ein Molybdän-Mangel vor, so wird die alternative Eisen-Eisen-Nitrogenase synthetisiert. (Schneider *et al.*, 1991). Dieses Enzym ist zwar nicht so produktiv, wie die Eisen-Molybdän-Nitrogenase (Übersicht in Ludden und Roberts, 1995), es kann aber unter Stickstoff-Mangelbedingungen durch die Fixierung von molekularem Stickstoff für ein Überleben des Bakteriums sorgen. Die beiden Proteine AnfD und NifN sind sich aber nicht nur in ihrer Funktion ähnlich, da sie beide für eine funktionelle Stickstoff-Fixierung sorgen, sie ähneln sich auch in ihrer Struktur. So weisen, wie bereits erwähnt, beide Proteine eine Oxidoreduktase-Domäne auf. Diese Domäne ist in Proteinen konserviert, die eine Rolle bei der Reduktion von Mehrfachbindungen in Molekülen spielen. Hier seien zum Beispiel die Nitrogenasen, aber auch die in die Chlorophyll- bzw. Bakteriochlorophyll-Synthese involvierten Enzyme genannt (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>). NifN selbst hat zwar keine reduktive Funktion, aber es muss als Cofaktor-Biosyntheseprotein in der Lage sein, den Cofaktor zu binden und muss deshalb strukturell der Nitrogenase, also dem eigentlichen Cofaktor-Bindeprotein ähnlich sein. NifN und AnfD weisen also beide eine Oxidoreduktase-Domäne auf und sind sich zu 31 % ihrer Aminosäuren homolog (Abb. 4.7). Gleichzeitig erwies sich, dass in beiden Proteinen der Bereich der Interaktion mit RegA innerhalb dieser Oxidoreduktase-Domäne liegt. Die beiden mit RegA interagierenden Sequenzen der Proteine überlappen innerhalb von 67 Aminosäuren. Dieser Bereich der Interaktion ist in einem

Sequenzvergleich der beiden Proteine in Abbildung 4.7 gezeigt. Dort wurde auch die Ähnlichkeit der beiden Proteine gegenübergestellt.

Eine Interaktion von RegA und Nitrogenase-Proteinen ist auf den ersten Blick nicht sehr wahrscheinlich. Nitrogenase ist ein Enzym, das unter Stickstoffmangel-Bedingungen bis zu 40 % des Gesamtproteins der Zelle stellt. Daher erscheint es unmöglich, dass dieses Protein eine Information von einem *response* Regulator erhält, der nur in wenigen Kopien innerhalb der Zelle vorliegt. Es wäre allerdings denkbar, dass die Interaktion von RegA und den Nitrogenase-Proteinen AnfD und NifN nur deshalb stattfand, weil beide eine Oxidoreduktase-Domäne enthalten. Diese Domäne ist wie bereits erwähnt auch in Bakteriochlorophyll-Synthese-Enzymen präsent. Daher wurde für weitergehende Untersuchungen nicht die Interaktion von AnfD und NifN mit RegA genauer untersucht. Vielmehr sollten andere Proteine, die eine Oxidoreduktase-Domäne aufweisen, auf eine mögliche Wechselwirkung mit RegA untersucht werden.

5.3.1 Untersuchung von BchB im 2-Hybridsystem

Eine starke Ähnlichkeit zur Nitrogenase in *R. capsulatus* weist die *dark protochlorophyllid oxidoreductase* (DPOR) auf (Fujita und Bauer, 2000). Dieses Enzym bewirkt die Reduktion von Bakterioprotchlorophyllid zu Bakteriochlorophyllid, also die Reduktion einer Doppelbindung zu einer Einfachbindung. Bereits im Aufbau des Proteins ist eine gewisse Ähnlichkeit zur Nitrogenase erkennbar (Abbildung 5.3). Beide Enzyme bestehen aus drei verschiedenen Protein-Untereinheiten und verwenden Energie in Form von ATP zur Reduktion von Mehrfachbindungen (Fujita und Bauer, 2000). Auch bei der Aufreinigung der beiden Enzyme konnte eine Ähnlichkeit festgestellt werden: beide Proteine erwiesen sich als sensitiv gegenüber Sauerstoff (Fujita und Bauer, 2000).

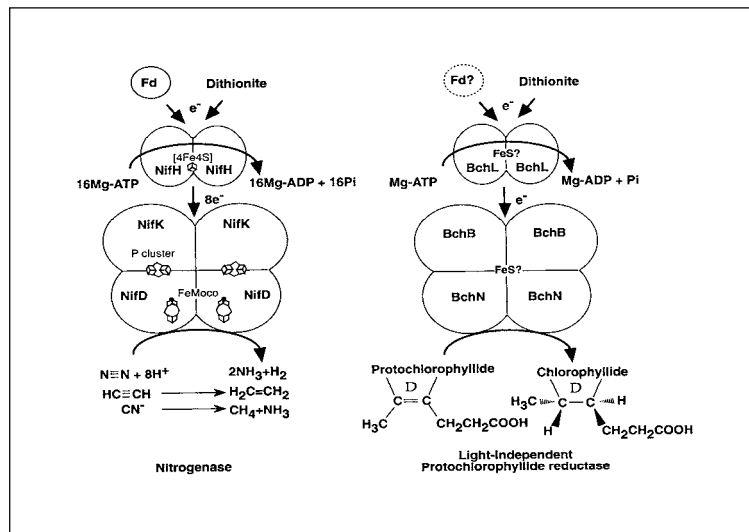


Abb. 5.3: Vergleich der Eisen-Molybdän-Nitrogenase und der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (DPOR) aus *R. capsulatus*: Beide Enzyme weisen einen ähnlichen Aufbau aus drei verschiedenen Protein-Untereinheiten auf. Die Nitrogenase reduziert unter ATP-Verbrauch die Dreifachbindung des molekularen Stickstoff-Moleküls. Die DPOR bewirkt ebenfalls ATP-abhängig die Reduktion von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid (nach Fujita und Bauer, 2000).

In *R. capsulatus* ist wie bereits erwähnt die Synthese von Pigmenten und Proteinen für den Photosyntheseapparat koreguliert (Rödig *et al.*, 1999). Nur wenn genügend Pigmente synthetisiert werden, kommt es auch zu einer starken Expression des *puf*- und des *puc*-Operons (Rödig *et al.*, 1999). Da RegA in die transkriptionelle Regulation des *puf*- und des *puc*-Operons involviert ist, wäre eine Wechselwirkung mit einem Enzym der Bakteriochlorophyll-Synthese ein Hinweis darauf, dass RegA auch die Synthese der Pigmente kontrollieren kann.

Aus diesem Grund wurde die BchB Untereinheit der DPOR im 2-Hybridsystem auf Interaktion mit RegA getestet. Es konnte allerdings keine Wechselwirkung von BchB und RegA im Hefesystem gefunden werden. Auch die Klonierung einer Domäne von BchB, die der Aminosäuresequenz homolog ist, die in AnfD und NifN zur Interaktion mit RegA beitrug, zeigte keinerlei Wechselwirkung mit dem *response* Regulator. Es ist natürlich möglich, dass BchB im Hefesystem nicht in der richtigen Konformation vorlag, oder dass die Interaktion von RegA und BchB nur in Gegenwart von Bakteriochlorophyll stattfinden kann. Aber diese Möglichkeiten müssen in weiteren Experimenten untersucht werden.

5.3.2 Untersuchung verschiedener Untereinheiten der Nitrogenase und nitrogenase-ähnlicher Proteine im Hefe 2-Hybridsystem

Zur genaueren Spezifizierung der Interaktion von RegA mit den Nitrogenase-Proteinen sollten weitere Untereinheiten der Nitrogenase auf eine Wechselwirkung mit RegA getestet werden. Weiterhin sollte das Protein NifH2 untersucht werden. Bei *Rhodobacter* gibt es, wie bereits erwähnt, eine Reihe von Proteinen, die zur Fe-Mo-Nitrogenase, bestehend aus den Untereinheiten NifH, NifD und NifK, homolog sind (Fujita und Bauer, 2000). Neben den Genen für die alternative Nitrogenase und die DPOR weisen auch die Gene *nifH2*, *nifD2* und *nifK2* eine starke Homologie zu den Genen der Fe-Mo-Nitrogenase auf (Klipp und Masepohl, unveröffentlicht). Allerdings wurden bisher nur die Gene *nifH2-D2-K2* gefunden. Es gibt keinerlei Hinweis darauf, ob diese Gene transkribiert werden und ein funktionelles Protein hergestellt wird. Da ein hypothetisches Protein NifH2-NifD2-NifK2 eine gewisse Ähnlichkeit zur DPOR aufweisen würde, könnte dieses Protein auch eine regulatorische Rolle spielen.

Ein solches System wurde bereits für die transkriptionelle Regulation der Hydrogenase-Gene in *Ralstonia eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus*) beschrieben (Lenz und Friedrich, 1998). Die Expression der beiden aktiven Hydrogenasen wird von einem Multiproteinkomplex kontrolliert, der das Protein HoxBC enthält. Dieses Protein ähnelt strukturell den Hydrogenasen, übernimmt aber keinerlei enzymatische Aufgaben. Es ist, wie auch die Hydrogenasen, in der Lage, molekularen Wasserstoff zu binden. Auf Grund dieser H₂-Bindung kann HoxBC die Sensorkinase des HoxJ/HoxA-Zweikomponentensystems binden und damit die Autophosphorylierung der Kinase verhindern. Daher wird auch der *response* Regulator HoxA nicht mehr phosphoryliert und kann in dieser unphosphorylierten Form die transkriptionelle Aktivierung der Hydrogenasegene bewirken (Lenz und Friedrich, 1998). Proteine, die Ähnlichkeit zu HoxBC aufweisen, wurden auch in *R. capsulatus* und *B. japonicum* gefunden (Bernhard *et al.*, 2001).

Sollte NifH2-NifD2-NifK2 eine solche regulatorische Funktion haben, so wäre es möglich, dass dieses Protein Bakteriochlorophyll bindet und die Information über die Anwesenheit des Pigments an den *response* Regulator RegA weiterleitet. RegA könnte dann seinerseits für die transkriptionelle Regulation von weiteren Genen sorgen. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass NifH2-NifD2-NifK2 eine regulatorische Nitrogenase darstellt, die eine Information über die Verfügbarkeit von molekularem Stickstoff an

den *response* Regulator RegA weitergibt und damit zur transkriptionellen Aktivierung von Stickstoff-Fixierungsgenen führt.

Bei der Untersuchung von NifH, NifD und NifH2 im Hefe 2-Hybridsystem konnte allerdings keine Interaktion mit RegA festgestellt werden. Von allen Proteinen wurde jeweils die vollständige Sequenz im Hefeklon exprimiert. Da aber sowohl NifD als auch NifN nicht in der Lage waren mit RegA zu interagieren, wenn das gesamte Protein in der Hefezelle exprimiert wurde, ist es möglich, dass auch für die Detektion der Interaktion von RegA mit weiteren nitrogenase-ähnlichen Proteinen nur die Klonierung eines Fragments des jeweiligen Moleküls notwendig ist. Es wäre auch möglich, dass die Interaktion von RegA und dem hypothetischen Protein-Komplex NifH2-NifD2-NifK2 innerhalb einer anderen Untereinheit als NifH2 des Proteins geschieht. Um hierüber genauere Aussagen machen zu können müssen sich weitergehende Experimente anschließen.

5.4 Untersuchung der Transkriptionsregulation des *puc*-Promotors in *Escherichia coli*

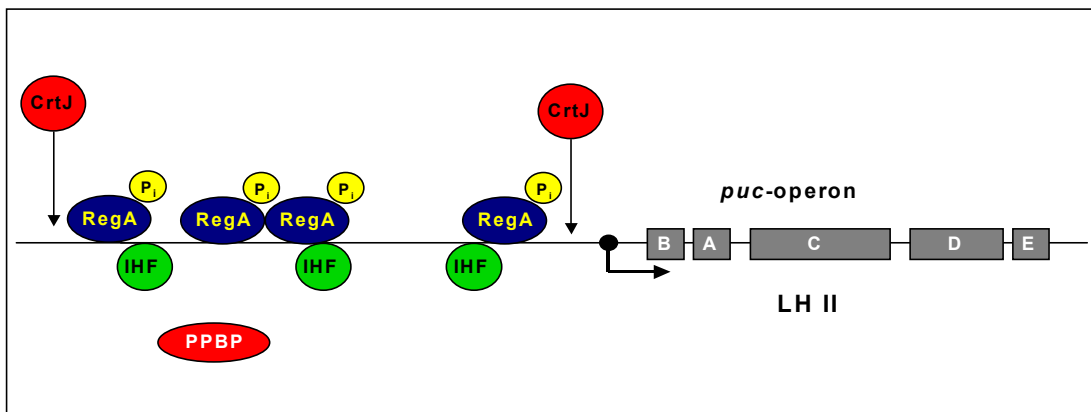
Es ist möglich, dass eine Interaktion von RegA mit anderen Proteinen die Bindung der Proteine an die Ziel-DNA erfordert. Wenn innerhalb der transkriptionellen Genregulation eine Reihe von Proteinen in der Promotorregion bindet, so können diese Proteine durch die unmittelbare Nähe zueinander auch miteinander in Wechselwirkung treten. Es ist schwierig, ein solches Regulationssystem in *Rhodobacter*-Zellen aufzuklären, da hier zu viele unbekannte Faktoren einen Einfluss auf die Genexpression haben können. Als Modellorganismus wurde deshalb *E. coli* verwendet. *E. coli* ist nicht in der Lage, Photosynthese zu betreiben. Daher sollten Proteine, die an der Regulation und der Synthese des Photosyntheseapparates in *R. capsulatus* beteiligt sind, in *E. coli* nicht vorhanden sein. Innerhalb der *E. coli* Zellen wurde ein System entwickelt, um die transkriptionelle Regulation des *puc*-Promotors durch RegA und andere Faktoren zu untersuchen. In der *puc*-Promotorregion binden, abhängig vom jeweiligen Sauerstoffpartialdruck, eine Reihe von Regulatorproteinen (Abb. 5.4). Ein zentraler Faktor bei der transkriptionellen Regulation des *puc*-Operons ist RegA (Sganga und Bauer, 1992). Daher wurde RegA zusammen mit anderen Proteinen in *E. coli* exprimiert und die Expression einer *puc*-Promotor-*lacZ*-Fusion gemessen. Da die Sensorkinase RegB aus *R. capsulatus* in *E. coli* in gleicher Weise in die Membran integriert wird wie in *Rhodobacter* (Chen *et al.*, 2000), wurden RegB und RegA in *E. coli* exprimiert und es

wurde untersucht, ob das Zweikomponentensystem RegB/RegA in *E. coli* funktionsfähig ist. Eine verstärkte Expression der β -Galaktosidase vom *puc*-Promotor aus konnte aber nicht festgestellt werden. Es werden also noch weitere Faktoren benötigt.

In *Agrobacterium tumefaciens* wurde ein ähnliches System aufgebaut (Lohrke *et al.*, 2000). Hier war zur Aktivierung eines *Agrobacterium*-spezifischen Promotors zusätzlich zu dem konstitutiv aktiven *response* Regulator des entsprechenden Zweikomponentensystems auch die α -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *A. tumefaciens* notwendig um den Promotor zu erkennen. Daher wurde auch die α -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *R. capsulatus* kloniert und zusammen mit dem RegB/RegA-System in *E. coli* exprimiert. Auch hier zeigte sich keine Expression der β -Galaktosidase vom *puc*-Promotor aus. Aus diesem Grund wurde RegA*, die konstitutiv aktive Form von RegA, statt des kompletten Zweikomponentensystems in *E. coli* verwendet. In den Zellen, die RegA* exprimierten, konnte eine deutlich erhöhte Expression der β -Galaktosidase gemessen werden.

Daraus lässt sich schließen, dass für die transkriptionelle Aktivierung des *puc*-Promotors ein phosphoryliertes oder konstitutiv aktives RegA vorhanden sein muss. Das Zweikomponentensystem RegB/RegA arbeitet trotz korrekter Insertion der Sensorkinase innerhalb der Membran von *E. coli* nicht. Eine Abhängigkeit der Aktivierung des *puc*-Promotors von der α -Untereinheit der RNA-Polymerase konnte nicht gezeigt werden. Allerdings bleibt unklar, ob ein solches Hybridenzym aus *E. coli* RNA-Polymerase und α -Untereinheit aus *R. capsulatus* überhaupt funktionsfähig ist. Auch ist der *puc*-Promotor ähnlich zur σ^{70} -Konsensus-Sequenz aufgebaut (Nickens und Bauer, 1998). Daher ist es möglich, dass dieser Promotor bereits von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird und daher keine Steigerung der Promotoraktivität bei Verwendung der α -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *R. capsulatus* zu beobachten war.

Auf Grund der Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass ein Testsystem etabliert werden konnte, das zur weiteren Analyse der transkriptionellen Regulation verschiedener *R. capsulatus* Promotoren genutzt werden kann. Um genauer zu untersuchen, ob noch weitere Faktoren wie z. B. der *integration host factor* (IHF) eine Rolle bei der Aktivierung des *puc*-Promotors spielen (Abb. 5.4), kann zusätzlich zu RegA* und der *puc*-Promotor-*lacZ*-Fusion eine Genbank von *R. capsulatus* in *E. coli* exprimiert werden. Wenn die β -Galaktosidase-Aktivität einiger Kolonien abweichend von den



6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollten mit Hilfe des Hefe 2-Hybridsystems Proteine identifiziert werden, die eine Interaktion mit dem *response* Regulator RegA von *R. capsulatus* zeigen. Zuerst wurde als eine Kontrolle die Interaktion der beiden Proteine des Zweikomponentensystems RegB und RegA untersucht. Nur bei Verwendung der konstitutiv aktiven Form RegA* konnte eine Wechselwirkung mit RegB festgestellt werden. Für die Interaktion innerhalb des Zweikomponentensystems scheint es also notwendig zu sein, dass eines der beiden Proteine, also RegB oder RegA phosphoryliert vorliegt. Auch eine Interaktion zweier Moleküle des konstitutiv aktiven RegA* konnte festgestellt werden. Dies deutet auf eine Dimerisierung des phosphorylierten *response* Regulators hin.

Bei der Suche nach Interaktionspartnern von RegA und RegA* im Hefe 2-Hybridsystem wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert. Alle für RegA* gefundenen interagierenden Proteine zeigten keine spezifische Wechselwirkung mit RegA*, sondern interagierten ebenso mit den Komponenten des 2-Hybridsystems. Als Interaktionspartner von RegA wurden unter anderem drei Proteine gefunden, die eine Rolle innerhalb der Stickstoff-Fixierung oder deren Regulation spielen. Diese Proteine NtrX, AnfD und NifN wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

NtrX scheint in den Zellen von *Rhodobacter* eine entscheidende Rolle zu spielen, da eine Deletion des entsprechenden Gens drastische Auswirkungen auf die Zellen hat. Die Mutation erwies sich als genetisch instabil, und nach einiger Zeit wurde der NtrX-Deletionsstamm von Suppressormutanten überwachsen. In einer phototrophen Kultur zeigte die NtrX-Deletionsmutante stark erhöhte Mengen an Photosynthese-(PS)-Komplexen verglichen mit dem Wildtypstamm.

Die Überexpression von NtrX in *R. capsulatus* führte zu einer um 30 % verminderten Menge an PS-Komplexen. Da die erhöhte Menge an PS-Komplexen bereits ein Grund für die Instabilität der *ntrX*-Deletion sein könnte, wurde eine Deletion von *ntrX* in *R. capsulatus* Δ RC6 vorgenommen, einem Stamm, der kein *puf*-Operon besitzt. Auch in dieser Δ RC6 Δ NtrX-Doppelmutante konnte eine erhöhte Menge an PS-Komplexen gefunden werden. Allerdings erwies sich auch die Doppelmutante als genetisch instabil, und auch hier reicherten sich Suppressormutanten an.

Zur Bestätigung der im Hefe 2-Hybridsystem gefundenen Interaktion von RegA und NtrX wurde ein GST-*pull-down-assay* durchgeführt.

Aus *E. coli* aufgereinigtes GST-NtrX zeigte keine Bindung an die Promotorregion des *puf*- und des *puc*-Operons. Nach einer gezielten Mutagenese der putativen Phosphorylierungsstelle von NtrX konnte eine Interaktion der NtrX-Variante D52E mit der Promotorregion des *puf*-Operons beobachtet werden. Diese Interaktion konnte innerhalb der Region *downstream* des Transkriptionsstarts des *puf*-Operons lokalisiert werden.

Zur Untersuchung der pleiotropen Effekte der *ntrX*-Deletion in *R. capsulatus* wurden 2D-gelelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt. Beim Vergleich von verschiedenen NtrX-Mutanten konnten deutliche Unterschiede im Proteinmuster der jeweiligen Stämme festgestellt werden.

Die Interaktion von RegA mit AnfD und NifN fand innerhalb einer in AnfD und NifN homologen Oxidoreduktase-Domäne statt. Diese Domäne existiert noch in einer Reihe weiterer Proteine, so beispielsweise auch in der *dark protochlorophyllid oxidoreductase* (DPOR). DPOR ist ein Enzym der Bakteriochlorophyll-Synthese. Da eine Interaktion von RegA mit einem Enzym der Pigmentsynthese eine physiologische Relevanz haben könnte, wurde die BchB Untereinheit der DPOR im Hefesystem auf Interaktion mit RegA getestet. Allerdings konnte keine Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen festgestellt werden. Auch durch die Untersuchung weiterer nitrogenase-ähnlicher Proteine im 2-Hybridsysteme konnten keine zusätzlichen Interaktionspartner von RegA identifiziert werden.

Bei der Untersuchung der Regulation des *puc*-Promotors in *E. coli* wurde eine direkte Abhängigkeit der Transkription von RegA* nachgewiesen. Im Gegensatz zu *A. tumefaciens* war es nicht notwendig, die α -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *R. capsulatus* zusätzlich in *E. coli* zu exprimieren. Dieses System kann jetzt zur weiteren Identifizierung von möglichen Regulatoren verwendet werden, die an der RegA-abhängigen Transkription des *puc*-Promotors beteiligt sind. Auch die Untersuchung von weiteren Promotor-*lacZ*-Fusionen aus *R. capsulatus* kann mit diesem System erfolgen.

7 LITERATUR

- Alberti, M.;** Burke, D.H. und Hearst, J.E. (1995) Structure and sequence of the photosynthesis gene cluster. In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. pp 1083-1106. Edited by Blankenship, R.E., Madigan, M.T. und Bauer, C.E. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Boston, London
- Appleby, J.L.;** Parkinson, J.S. und Bourret, R.B.(1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 68: 845-848
- Austin, S.;** Henderson, N. und Dixon, R. (1987) Requirements for transcriptional activation *in vitro* of the nitrogen-regulated *glnA* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*: dependence on activator concentration. *Mol. Microbiol.* 1: 92-100
- Baikalov, I.;** Schroder, I.; Kaczor-Grzeskowiak, M.; Grzeskowiak, K.; Gunsalus, R.P. und Dickerson, R.E. (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry.* 35: 11053-11061.
- Bauer, C.;** Buggy, J. und Mosley, C. (1993) Control of photosystem genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Trends Genet.* 9: 56-60
- Bauer, C.E.;** Buggy, J.J.; Yang, Z.M. und Marrs, B.L. (1991) The superoperonal organization of genes for pigment biosynthesis and reaction center proteins is a conserved feature in *Rhodobacter capsulatus*: analysis of overlapping *bchB* and *puhA* transcripts. *Mol. Gen. Genet.* 228: 433-444
- Bernhard, M.;** Buhrke, T., Bleijlevens, B., de Lacey, A.L., Fernandez, V.M., Albracht, S.P.J. und Friedrich, B. (2001) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and ist interaction with a histidine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 15592-15597
- Birck, C.;** Mourey, L.; Gouet, P.; Fabry, B.; Schumacher, J.; Rousseau, P.; Kahn, D. und Samama, J.P. (1999) Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure Fold. Des.* 7: 1505-1515
- Bird, T.H.;** Du, S. und Bauer, C.E. (1999) Autophosphorylation, phosphotransfer, and DNA-binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 274: 16343-16348
- Birnboim, H.C.** und Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523

- Bowman, W.C.;** Du, S.; Bauer, C.E. und Kranz, R.G. (1999) *In vitro* activation and repression of photosynthesis gene transcription in *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Microbiol. 33: 429-437
- Brown, J.M.** und Firtel, R.A. (1998) Phosphorelay signalling: New tricks for an ancient pathway. Curr. Biol. 8: R662-R665
- Chen, C.-Y.A.;** Beatty, J.T., Cohen, S.N. und Belasco, J.G. (1988) An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but but insufficient for puf mRNA stability. Cell 40: 171-181
- Chen, P.** und Reitzer, L.J. (1995) Active contribution of two domains to cooperative DNA binding of the enhancer-binding protein nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*: stimulation by phosphorylation and the binding of ATP. J. Bacteriol. 177: 2490-2496
- Chen, W.;** Jäger, A. und Klug, G. (2000) Correction of the DNA sequence of the *regB* gene of *Rhodobacter capsulatus* with implications for the membrane topology of the sensor kinase RegB. J. Bacteriol. 182: 818-820
- Clarke, L.** und Carbon, J. (1992) A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids prerepresentative of the entire *E. coli* genome. Biotechnology 24: 179-187
- Da Re, S.;** Schumacher, J.; Rousseau, J.F.; Ebel, C. und Kahn, D. (1999) Phosphorylation- induced dimerization of the FixJ receiver domain. Mol. Microbiol. 34: 504-511
- Dhavan, G.M.;** Crothers, D.M., Chance, M.R. und Brenowitz, M. (2002) Concerted binding and bending of DNA by *Escherichia coli* Integration Host Factor. J. Mol. Biol. 315: 1027-1037
- Du, S.;** Bird, T.H. und Bauer, C.E. (1998) DNA-binding characteristics of RegA. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J. Biol. Chem. 273: 18509-18513
- Dubbs, J.M.;** Bird, T.H.; Bauer, C.E. und Tabita, F.R. (2000) Interaction of CbbR and RegA* transcription regulators with the *Rhodobacter sphaeroides cbbI*-Promoter-operator region. J. Biol. Chem. 275: 19224-19230
- Elsen, S.;** Dischert, W.; Colbeau, A. und Bauer, C.E. (2000) Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. J. Bacteriol. 182: 2831-2837

- Eraso, J.M.** und Kaplan, S. (1994) PrrA, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 176: 32-43
- Feng, J.**; Atkinson, M.R.; McCleary, W.; Stock, J.B.; Wanner, B.L. und Ninfa, A.J. (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174: 6061-6070
- Fidai, S.**; Hinchigeri, S.B.; Borgford, T.J. und Richards, W.R. (1994) Identification of the PufQ protein in membranes of *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 176: 7244-7251
- Fidai, S.**; Hinchigeri, S.B. und Richards, W.R. (1994) Association of protochlorophyllide with the PufQ protein of *Rhodobacter capsulatus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 1679-1684
- Fidai, S.**; Dahl, J.A. und Richards, W.R. (1995) Effect of the PufQ protein on early steps in the pathway of bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. FEBS Lett. 372: 264-268
- Fiedler, U.** und Weiss, V. (1995) A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. EMBO J. 14: 3696-3705
- Figurski, D.H.** und Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652
- Fonstein, M.** und Haselkorn, R. (1993) Chromosomal structure of *Rhodobacter capsulatus* strain SB1003: cosmid encyclopedia and high-resolution physical and genetic map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2522-2526
- Foster-Hartnett, D.** und Kranz, R.G. (1992) Analysis of the promoters and upstream sequences of *nifA1* and *nifA2* in *Rhodobacter capsulatus*; activation requires *ntrC* but not *rpoN*. Mol. Microbiol. 6:1049-1060
- Fujita, Y.** und Bauer, C.E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. *In vitro* confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme. J. Biol. Chem. 275: 23583-23588
- Galinier, A.**; Garnerone, A.M.; Reyrat, J.M.; Kahn, D.; Batut, J. und Boistard, P. (1994) Phosphorylation of the *Rhizobium meliloti* FixJ protein induces its binding to a compound regulatory region at the *fixK* promoter. J. Biol. Chem. 269: 23784-23789

- Gilles-Gonzales, M.A.;** Ditta, G.S. und Helinski, D.R. (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *R. meliloti*. *Nature* 350: 170-172
- Gomelsky, M.;** Horne, I.M.; Lee, H.J.; Pemberton, J.M.; McEwan, A.G. und Kaplan, S. (2000) Domain structure, oligomeric state, and mutational analysis of PpsR, the *Rhodobacter sphaeroides* repressor of photosystem gene expression. *J. Bacteriol.* 182: 2253-2261
- Gomelsky, M.** und Kaplan, S. (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Bacteriol.* 179: 128-134
- Gomelsky, M.** und Kaplan, S. (1998) AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel FAD binding domain. *J. Biol. Chem.* 273: 35319-35325
- Gregor, J.** und Klug G. (1999) Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 1-9
- Hebermehl, M.** (1999) Einfluss von Sauerstoff auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen bei der Bildung des Photosyntheseapparates von *Rhodobacter capsulatus*. Doktorarbeit am Inst. f. Mikro- und Molekularbiologie AG Klug; Justus Liebig Universität, Gießen
- Hemschemeier, S.K.;** Kirndörfer, M.; Hebermehl, M. und Klug, G. (2000a) DNA binding of wild type RegA protein and its differential effect on the expression of pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 235-243
- Hemschemeier, S.K.;** Ebel, U.; Jäger, A.; Kirndörfer, M. und Klug, G. (2000b) *In vivo* and *in vitro* analysis of RegA response regulator mutants of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 291-300
- Hoch, J.A.** und Varughese, K.I. (2001) Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J. Bacteriol.* 183: 4941-4949
- Hu, J.C.;** Kornacker, M.G. und Hochschild, A. (2000) *Escherichia coli* one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions. *Methods* 20:80-94
- Hübner, P.;** Masepohl, B.; Klipp, W. und Bickle, T.A. (1993) *nif* gene expression studies in *Rhodobacter capsulatus*: *ntrC*-independent repression by high ammonium concentrations. *Mol. Microbiol.* 10: 123-132

- Hunter, T.** (1995) Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236
- Jones, R.** und Haselkorn, R. (1989) The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *ntxA*, *ntxB* and *ntxC* gene analogues required for nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 215: 507-516
- Karimova, G.**; Pidoux, J.; Ullmann, A. und Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5752-5756
- Keen, N.T.**; Tamaki, S.; Kobayashi, D. und Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197
- Kennelly, P.J.** und Potts, M. (1996) Fancy meeting you here! a fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J. Bacteriol.* 178: 4759-4764
- Kern, M.**; Kamp, P.B.; Paschen, A.; Masepohl, B. und Klipp, W. (1998) Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA. *J. Bacteriol.* 180: 1965-1969
- Kirndörfer, M.**; Jäger, A. und Klug, G. (1998) Integration host factor affects the oxygen-regulated expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* 258: 297-305
- Klipp, W.**; Masepohl, B. und Puhler, A. (1988) Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *J. Bacteriol.* 170: 693-699
- Klose, K.E.**; Weiss, D.S. und Kustu, S. (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J. Mol. Biol.* 232: 67-78
- Klug, G.** (1991) A DNA sequence upstream of the *puf* operon of *Rhodobacter capsulatus* is involved in its oxygen-dependent regulation and functions as a protein binding site. *Mol. Gen. Genet.* 226: 167-176
- Klug, G.** (1991) Endonucleolytic degradation of *puf* mRNA in *R. capsulatus* is influenced by oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1765-1769
- Klug, G.** (1993) The role of mRNA degradation in the regulated expression of bacterial photosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 9: 1-7

Klug, G. und Cohen, S.N. (1988) Pleiotropic effects of localized *Rhodobacter capsulatus* *puf* operon deletions on production of light-absorbing pigment-protein complexes. J. Bacteriol. 170: 5814-5821

Klug, G.; Gad'on, N.; Jock, S. und Narro, M.L. (1991) Light and oxygen effects share a common regulatory DNA sequence in *Rhodobacter capsulatus*. Mol Microbiol. 5: 1235-1239

Klug, G. und Jock, S. (1991) A base pair transition in a DNA sequence with dyad symmetry upstream of the *puf* promoter affects transcription of the *puc* operon in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 173: 6038-6045

Knippers, R. (1997) Molekulare Genetik 7. durchgesehene und korrigierte Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart

Kovach, M.E.; Elzer, P.H.; Hill, D.S.; Robertson, G.T.; Farris, M.A.; Roop, R.M. 2nd und Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176

Kranz, R.G. und Cullen, P.J. (1995) Regulation of Nitrogen Fixation Genes. In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. pp 1191-1208. Edited by Blankenship, R.E., Madigan, M.T. und Bauer, C.E. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Boston, London

Kranz, R.G. und Foster-Hartnett, D. (1990) Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: oxygen- and nitrogen-responsive factors. Mol. Microbiol. 4: 1793-1800

Le Blanc, H.N. und Beatty, J.T. (1996) Topological analysis of the *Rhodobacter capsulatus* PucC protein and effects of C-terminal deletions on light-harvesting complex II. J. Bacteriol. 178: 4801-4806

Legrain, P. und Selig, L. (2000) Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. FEBS Lett. 480: 32-36

Lenz, O. und Friedrich, B. (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12474-12479

Liebmann, C. (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. Cell. Signal. 13: 777-785

Lilburn, T.G.; Haith, C.E.; Prince, R.C. und Beatty, J.T. (1992) Pleiotropic effects of *pufX* gene deletion on the structure and function of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter capsulatus*. Biochim. Biophys. Acta 1100: 160-170

- Lohrke, S.M.;** Nechaev, S.; Yang, H.; Severinov, K. und Jin, S.J. (1999) Transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene promoters in *Escherichia coli* requires the *A. tumefaciens rpoA* gene, encoding the alpha subunit of RNA polymerase. J. Bacteriol. 181: 4533-4539
- Ludden, P.W.** und Roberts, G.P. (1995) The biochemistry of nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. pp 929-947. Edited by Blankenship, R.E., Madigan, M.T. und Bauer, C.E. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Boston, London
- Lupas, A.;** und Stock, J. (1989) Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methylesterase in bacterial chemotaxis. J. Biol. Chem. 264: 17337-17342
- Madigan, M.T.** (1995) Microbiology of nitrogen fixation by anoxygenic photosynthetic bacteria. In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. pp 915-928. Edited by Blankenship, R.E., Madigan, M.T. und Bauer, C.E. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Boston, London
- Masepohl, B.;** Klipp, W. und Puhler, A. (1988) Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gen. Genet. 212: 27-37
- Mattison, K.** und Kenney, L.J. (2002) Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ. J. Biol. Chem.[z.Z. nur elektronisch publiziert]
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Moreno-Vivian, C.;** Schmehl, M.; Masepohl, B.; Arnold, W. und Klipp, W. (1989) DNA sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus nifENX* gene region: homology between NifX and NifB suggests involvement of NifX in processing of the iron-molybdenum cofactor. Mol. Gen. Genet. 216:353-363
- Mosley, C.S.,** Suzuki, J.Y. und Bauer, C.E. (1994) Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. J. Bacteriol. 176: 7566-7573
- Nickens, D.G.** und Bauer, C.E. (1998) Analysis of the *puc* operon promoter from *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 180: 4270-4277

- Nixon, B.T.;** Ronson, C.W. und Ausubel, F.M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7850-7854
- O'Gara, J.P.** und Kaplan, S. (1997) Evidence for the role of redox carriers in photosynthesis gene expression and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Bacteriol. 179: 1951-1961
- Oh, J.I.** und Kaplan, S. (2000) Redox signaling: globalization of gene expression. EMBO J. 19: 4237-4247
- Oh, J.-I.;** Ko, I.-J. und Kaplan, S. (2001) The default state of the membrane-localized histidine kinase PrrB of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is in the kinase-positive mode. J. Bacteriol. 183: 6807-6814
- Ouchane, S.** und Kaplan, S. (1999) Topological analysis of the membrane-localized redox-responsive sensor kinase PrrB from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Biol. Chem. 274: 17290-17296
- Pasternak, C.;** Haberzettl, K. und Klug, G. (1999) Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 181: 100-106
- Pawlowski, K.;** Klosse, U. und de Bruijn, F.J. (1991) Characterization of a novel Azorhizobium caulinodans ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. Mol. Gen. Genet. 231: 124-138
- Ponnampalam, S.N.** und Bauer, C.E. (1997) DNA binding characteristics of CrtJ. A redox-responding repressor of bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J. Biol. Chem. 272: 18391-18396
- Porter, S.C.;** North, A.K. und Kustu, S. (1995) Mechanism of transcriptional activation by NtrC. In: Two-component signal transduction, Edited by Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. American Society of Microbiology; Washington DC
- Reitzer, L.J.** und Magasanik, B. (1986) Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. Cell 45: 785-792
- Repik, A.;** Rebbapragada, A.; Johnson, M.S.; Haznedar, J.O.; Zhulin, I.B. und Taylor, B.L. (2000) PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 36: 806-816

- Rödig, J.;** Jock, S. und Klug, G. (1999) Coregulation of the syntheses of bacteriochlorophyll and pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. Arch. Microbiol. 171: 198-204
- Roh, J.H.** und Kaplan, S. (2000) Genetic and phenotypic analyses of the *rdx* locus of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Bacteriol. 182: 3475-3481
- Schägger, H.** und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379
- Schlegel, H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart pp 409-410
- Schneider, K.;** Müller, A.; Schramm, U. und Klipp, W. (1991) Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. Eur. J. Biochem. 195: 653-661
- Schüddekopf, K.;** Hennecke, S.; Liese, U.; Kutsche, M. und Klipp, W. (1993) Characterization of *anf* genes specific for the alternative nitrogenase and identification of *nif* genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Microbiol. 8:673-684
- Schuster, M. ;** Silversmith, R.E. und Bourret, R.B. (2001) Conformational coupling in the chemotaxis response regulator CheY. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6003-6008
- Scolnik, P.A.** und Haselkorn, R. (1984) Activation of extra copies of genes coding for nitrogenase in *Rhodospseudomonas capsulata*. Nature 307: 289-292
- Sganga, M.W.** und Bauer, C.E. (1992) Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. Cell 68: 945-954
- Simon, et al.** (1983) Biol. Technol. 1: 784-791
- Stock, A.M.;** Koshland, D.E., Jr und Stock, J.B. (1985) Homologies between the *Salmonella typhimurium* CheY protein and proteins involved in the regulation of chemotaxis membrane protein synthesis, and sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7989-7993
- Stock, J.B.;** Surette, M.G.; Levit, M. und Park, P. (1995) Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In: Two-component signal transduction, Edited by Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. American Society of Microbiology; Washington DC

Swem, L.R.; Elsen, S.; Bird, T.H.; Swem, D.L.; Koch, H.G.; Myllykallio, H.; Daldal, F. und Bauer, C.E. (2001) The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Biol. 309: 121-138

Taremi, S.S. und Marrs, B.L. (1990) Regulation of gene expression by oxygen. In: Phototrophic Bacteria. The molecular basis of bacterial metabolism (Hauska, G., Thauer, R., Eds.) pp. 146-151; Springer Verlag, Berlin

Taylor, D.P.; Cohen, S.N.; Clark, W.G. und Marrs, B.L. (1983) Alignment of genetic and restriction maps of the photosynthesis region of the *Rhodopseudomonas capsulata* chromosome by a conjugation-mediated marker rescue technique. J. Bacteriol. 154: 580-590

Taylor, B.L.; Zhulin, I.B. und Johnson, M.S. (1999) Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 53: 103-128

Tichy, H.V.; Albien, K.U.; Gad'on, N. und Drews, G. (1991) Analysis of the *Rhodobacter capsulatus* *puc* operon: the *pucC* gene plays a central role in the regulation of LH-II (B800-850 complex) expression. EMBO J. 10: 2949-2955

Tichy, H.V.; Oberle, B.; Stiehle, H.; Schiltz, E. und Drews, G. (1989) Genes downstream from *pucB* and *pucA* are essential for formation of the B800-850 complex of *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 171: 4914-4922

Tucker ,C.L.; Gera, J.F. und Uetz, P. (2001) Towards an understanding of complex protein networks. Trends Cell. Biol. 11:102-106

Vichivanives, P.; Bird, T.H.; Bauer, C.E. und Tabita, F.R. (2000) Multiple regulators and their interactions *in vivo* and *in vitro* with the *cbb* regulons of *Rhodobacter capsulatus*. J. Mol. Biol. 300: 1079-1099

Volz, K. (1995) Structural and functional conservation in response regulators. In: Two-component signal transduction, Edited by Hoch, J.A. und Silhavy, T.J. American Society of Microbiology; Washington DC

Wassem, R., De Souza, E.M., Yates, M.G., Pedrosa, F.D.und Buck, M. (2000) Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. Mol. Microbiol. 35: 756-764

Wellington, C.L.; Taggart, A.K. und Beatty, J.T. (1991) Functional significance of overlapping transcripts of *crtEF*, *bchCA*, and *puf* photosynthesis gene operons in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 173: 2954-2961

- Wong, D.K.;** Collins, W.J.; Harmer, A.; Lilburn, T.G. und Beatty, J.T. (1996) Directed mutagenesis of the *Rhodobacter capsulatus puhA* gene and orf 214: pleiotropic effects on photosynthetic reaction center and light-harvesting 1 complexes. J. Bacteriol. 178: 2334-2342
- Yeliseev, A.A.** und Kaplan, S. (1999) A novel mechanism for the regulation of photosynthesis gene expression by the TspO outer membrane protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Biol. Chem. 274: 21234-21243
- Young, D.A.;** Bauer, C.E.; Williams, J.C. und Marrs, B.L. (1989) Genetic evidence for superoperon organization of genes for photosynthetic pigments and pigment-binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gen. Genet. 218: 1-12
- Zeilstra-Ryalls, J.H.** und Kaplan, S. (1995) Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene. J. Bacteriol. 177: 6422-6431
- Zeng, X.** und Kaplan, S. (2001) TspO as a modulator of the repressor/antirepressor (PpsR/AppA) regulatory system in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Bacteriol. 183: 6355-6364
- Zhu, Y.S.** und Hearst, J.E. (1986) Regulation of expression of genes for light-harvesting antenna proteins LH-I and LH-II; reaction center polypeptides RC-L, RC-M, and RC-H; and enzymes of bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* by light and oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7613-7617

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| A oder Ade | Adenin |
| AA | Acrylamid |
| Abb. | Abbildung |
| AB | Antibiotikum |
| ad | auffüllen auf |
| AD | Aktivator-domäne |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| <i>as</i> | <i>antisense</i> |
| ATP | Adenosin-triphosphat |
| <i>avg.</i> | durchschnittlich (<i>average</i>) |
| BA | Bisacrylamid |
| Bch | Bakteriochlorophyll |
| BD | Bindedomäne |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>) |
| C | Cytosin |
| Ci | Curie |
| Cpm | <i>counts per minute</i> |
| D | Aspartat |
| Da | Dalton |
| ddNTP | Di-Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| ds | doppelsträngig |
| E | Glutaminsäure |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure |
| <i>et al.</i> | und andere (<i>et altera</i>) |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| <i>g</i> | Gravitationskonstante |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GB | Genbank |
| Gm | Gentamycin |
| GST | Glutathion-S-Transferase |

| | |
|-----------------|---|
| h | Stunde |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazi-N'-2-Ethansulfonsäure |
| H oder His | Histidin |
| HTH | <i>Helix-turn-Helix</i> -Motiv |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| Km | Kanamycin |
| l | Liter |
| LH-I | Antennenpigment-Komplex I (<i>light-harvesting complex I</i>) |
| LH-II | Antennenpigment-Komplex II (<i>light-harvesting complex II</i>) |
| L oder Leu | Leucin |
| Lsg. | Lösung |
| μ | Mikro |
| m | Milli |
| M | Molar (mol/l) |
| mA | Milliampere |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| mRNA | <i>messenger</i> RNA |
| n | Nano |
| N | Asparagin |
| nm | Nanometer |
| nt | Nukleotid |
| OD | optische Dichte |
| ORF | offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>) |
| p | Pico |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacralamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| PS | Photosynthese |
| PSA | Photosyntheseapparat |
| RC | Reaktionszentrum |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehung pro minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |

| | |
|------------|--------------------------------------|
| SD | Synthetisches <i>Dropout</i> Medium |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunden |
| ss | einzelsträngig |
| St I | Standard I Medium |
| | |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| Tc | Tetracyclin |
| TEMED | N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| T oder Trp | Tryptophan |
| | |
| U | Einheit (<i>unit</i>) |
| UV | Ultraviolett |
| | |
| V | Volt |
| | |
| wt | Wildtyp |

8.2 Gesamtübersicht aller Proteine, die eine Interaktion mit RegA im 2-Hybridsystem zeigten

| Nummer des Genbank-Klons | Putative Funktion des Proteins | Nummer R. capsulatus Datenbank WIT |
|--------------------------|---|------------------------------------|
| 1 | putative ATPase | RRC 01552 |
| 3 | ATP-Bindeprotein | RRC 01156 |
| 9 | Eisen-Molybdän-Cofaktor-Biosynthese-Protein NifN | RRC 00430 |
| 10 | - | RRC 03508 |
| 22 | ? | ? |
| 28 | Eisenreguliertes Protein FrpC | RRC 01604 |
| 33 | Nitrogenase Eisen-Eisen α-Kette AnfD | RRC 02047 |
| 45 | Translations-Elongationsfaktor | RRC 03078 |
| 46 | NtrX | RRC 02425 |
| 59 | Hypothetisches exportiertes Protein | RRC 01919 |
| 64 | RecA | RRC 03447 |
| 76 | Periplasmatischer Dipeptid-Transportprotein-Vorläufer | RRC 01964 |
| 83 | unbekannte Funktion | RRC 01641 |
| 86 | NtrX | RRC 01361 |
| 107 | Nuklease Untereinheit des Exzinuklease-Komplexes UvrC | RRC 02955 |
| 108 | RecA | RRC 03447 |
| 109 | Eisenreguliertes Protein FrpC | RRC 01604 |
| 113 | ? | ? |
| 116 | ? | ? |
| 119 | Translations-Elongationsfaktor | RRC 03078 |
| 127 | Nuklease Untereinheit des Exzinuklease-Komplexes UvrC | RRC 02955 |
| 133 | Nitrogenase Eisen-Eisen α-Kette AnfD | RRC 02047 |
| 139 | ? | ? |

Tabelle 8.1: Interaktionspartner von RegA im Hefe 2-Hybridsystem: Die Tabelle enthält die Daten der experimentell identifizierten Proteine, die im Hefe 2-Hybridsystem eine Interaktion mit RegA zeigten. Gezeigt sind die Genbankklone, die ein *insert* enthielten, das in korrekter Orientierung im Hefeexpressionsvektor inseriert war. **Spalte 1:** Nr. des entsprechenden Genbank-Klons von *S. cerevisiae* AH109. **Spalte 2:** Angegeben ist die putative oder experimentell nachgewiesene Funktion des jeweiligen Proteins. **Spalte 3:** Die jeweilige Nummer der *Rhodobacter* Datenbank WIT (<http://wit.mcs.anl.gov/WIT2>) wurde hier angegeben. Fettgedruckt sind die Proteine dargestellt, die zur weiteren Untersuchung verwendet wurden. Bei einigen Proteinen konnte keinerlei Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen gefunden werden. Daher sind in diesem Falle „?“ in den entsprechenden Zeilen eingetragen.

Veröffentlichungen

Gregor, J. und Klug, G. (1999) Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. FEMS Microbiol. Lett. 179: 1-9; Review

Gregor, J. und Klug, G. (2002) Oxygen-regulated expression of genes for pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. im Druck; Review

Teilnahme an Kongressen mit eigenem Beitrag (Vorträge und Posterpräsentationen)

Jutta Gregor, Kerstin Haberzettl und Gabriele Klug (1999) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. 5. Werkstattberichte aus Natur- und Lebenswissenschaften Methoden- und Informationsbörse, Giessen; Posterpräsentation

Jutta Gregor, Katharina Hemschemeier, Kerstin Haberzettl und Gabriele Klug (1999) Untersuchungen am Responseregulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. Tagungsband des Symposiums „Mechanismen der Genregulation bei Mikroorganismen“ in Ohrbeck bei Osnabrück; Vortrag

Jutta Gregor, Kerstin Haberzettl und Gabriele Klug (2000) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. Biospektrum Sonderausgabe 2000, S. 73, Frühjahrstagung der VAAM in München; Posterpräsentation

Jutta Gregor und Gabriele Klug (2000) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. Abstracts of the 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP 2000) p. 109, Barcelona, Spanien; Vortrag

Jutta Gregor und Gabriele Klug (2000) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. Abstracts of the 7th DFG-Symposium on regulatory networks in bacteria, Bad Herrenalb; Vortrag

Jutta Gregor (2000) Redoxabhängige Genregulation bei Purpurbakterien. Tagungsband des Kolloquiums „Bioenergetik der Bakterien“, Mauloff/Taunus; Vortrag

Jutta Gregor und Gabriele Klug (2001) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. Biospektrum Sonderausgabe 2001, S. 98, Frühjahrstagung der VAAM in Oldenburg; Posterpräsentation

Jutta Gregor und Gabriele Klug (2001) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. Tagungsband des Symposiums „Gene transfer and gene regulation in microorganisms“ in Wien; Vortrag

Jutta Gregor und Gabriele Klug (2001) Identification of proteins interacting with response regulator RegA in *Rhodobacter capsulatus*. 5. Workshop des Graduiertenkollegs „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“, Schloss Rauischholzhausen bei Giessen; Posterpräsentation

Danke.....

- Frau Prof. Dr. Gabriele Klug, für das schöne Projekt, das ich während meiner Doktorarbeit bearbeiten konnte. Weiterhin vielen Dank für viele gute Tipps, wie man an das eine oder andere wissenschaftliche Problem herangehen sollte.
- Herrn Prof. Dr. R. Renkawitz, für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur und der Zweitbetreuung meiner Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs.
- Herrn Prof. Dr. A. Pingoud, Frau Dr. Jamilah Michel und dem ganzen Graduiertenkolleg „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“, für viele hilfreiche Tipps und jede Menge Diskussionsbereitschaft (besonderer Dank an Udo Möhren, ohne dessen Hilfe ich bestimmt etwas länger an den GST-*pull-downs* getüftelt hätte....).
- Herrn Prof. K. Forchhammer, für die Zeit, die ich zusammen mit Stephie an der 2D-Gelelektrophorese-Apparatur seiner Arbeitsgruppe zubringen durfte und natürlich auch für die erstklassigen Erklärungen, die nicht zuletzt zu den schönen Aufnahmen in dieser Arbeit geführt haben.
- Stephie, für eine schöne gemeinsame Zeit im Labor. Weißt Du eigentlich, dass Du seit Januar neben den TA's die Laborälteste bist? Tja, Christian schrieb's bei mir, jetzt schreib ich's bei Dir: „Du bist die Nächste“. Wir müssen uns demnächst mal absprechen, was wir als nächstes beruflich machen, nach so langer Zeit (immerhin schon etwa 16 Jahre!!!) können wir doch unmöglich an zwei verschiedenen Arbeitsplätzen unterkommen.
- Andreas, für all die kleinen Dinge, ohne die die Arbeit im Labor einfach unmöglich wäre. Dafür, dass Du auch bei „Massenbestellungen“ meinerseits nie die Nerven verloren hast... Außerdem natürlich auch dafür, dass Du mich (auch wenn Du manchmal die Hasskappe aufhattest) fast täglich zum Lachen bringen konntest. Übrigens: Lach' doch mal Andreas!
- Kuanyu, for beeing a really nice lab neighbour. Also thanks for taking care of several gels and cultures which wanted to be incubated on weekends or really late in the evening...! You are incredible, Kuanyu!
- Elena, für äußerst große Diskussionsbereitschaft und jede Menge gute Tipps. Auch dafür, dass Du jedes Mal ein Ohr dafür hattest, ob ich nun himmelhochjauchzend oder zu Tode betrübt über meine wissenschaftlichen Ergebnisse war...
- Stephan, der *Northern*-Mann: danke für viele interessante Diskussionen über Wissenschaft, Labor und überhaupt. Nimm's nicht so schwer, viele *Northerns* brauchst Du zum Zusammenschreiben bestimmt nicht mehr...!

Danke.....

- Anke, für die vielen guten Ideen, wie man alle meine teilweise konfuse Daten in ein regulatorisches Netzwerk einbauen kann. Auch noch mal ganz herzlichen Dank fürs Korrekturlesen.
- Tanja, für den frischen Wind, den Du und Silke wieder in unser Labor gebracht haben. Es hat echt immer viel Spaß gemacht, mit Dir zusammenzuarbeiten.
- Christian, für all den Spaß, den wir im Labor hatten. Es ist ziemlich ruhig geworden, seitdem Du weg bist...! Danke auch, dass Du nie genervt warst (oder ich es nie gemerkt habe??), wenn ich Dich zum x. Mal gefragt habe, wie man mit der GradiFrac umgeht...!
- Silke, für lustige Szenen unter der Labordusche...! Wann habt ihr eigentlich das letzte Mal getestet ob noch Wasser drin ist? Ich glaube es wäre mal wieder an der Zeit! Das nächste Mal machen wir dann ein Foto und schicken es nach Indien.
- Kerstin, für viel Hilfe mit den Hefen. Ich sag' nur: "I love yeast". Wann kommst Du eigentlich wieder?
- Carmen, für die vielen Klonierungen, die Du für mich gemacht hast und die Dir bestimmt nicht immer Freude bereitet haben...! Aber es geht doch nichts darüber, wenn man morgens reinkommt und Klone gewachsen sind (auch wenn man später merkt, dass es die Vektorkontrolle war...!).
- Elisabeth, für viele experimentelle Tricks, ohne die mancher Versuch bestimmt viel länger gedauert hätte („...das kann man übers Wochenende stehen lassen!“). Und Deine gute Laune war auch meist ansteckend.
- Emad, thanks for many interesting discussions concerning Egypt and the egyptian lifestyle. One day I have to go there and visit the pyramids.
- Zsuzsanna, dafür, dass Du als „meine“ erste Praktikantin und später Diplomandin immer sehr geduldig mit mir warst.
- Franziska, für all die harten Sprüche, die für eine deutliche Aufhellung des Laboralltags gesorgt haben („...den brauchst Du net zu fragen, der hat eh' geschlafen!“). Mach' Dir nichts draus, aber das machst Du ja eh' nicht, oder?
- Angelika, für die vielen schönen Flaschen mit RÄ- und St.I-Medium und für die vielen Puffer, ohne die so manche Elektrophorese unmöglich wäre.
- Lisa Osterloh, für große Hilfe bei der Fertigstellung der letzten Ergebnisse. Du hast die Laborarbeit echt sehr schnell drauf gehabt, besser hätte ich die Versuche auch nicht machen können.

Danke.....

- Ralf und Lisa, dafür, dass ihr fast immer Verständnis dafür hattet, wenn ich mal wieder „etwas“ später heimgekommen bin. Und auch dafür, dass Lisa meist ohne zu Murren mit mir am Wochenende „mal kurz“ nach Giessen gefahren ist („...fahren wir schon wieder an die Uni?“). Danke auch Lisa, für die vielen Bilder, mit denen Du meinen Arbeitsplatz verschönert hast. Dir, Ralf, danke ich dafür, dass Du meine Launen ertragen hast, wenn das „allesentscheidende“ Experiment mal wieder schiefgegangen ist...! Ihr seid die beste Familie, die man sich wünschen kann!
- meinen Eltern und Schwiegereltern, ohne deren Hilfe die Arbeit sicherlich äußerst stressig geworden wäre. Wenn ich alles aufschreiben würde, wobei ihr geholfen habt, dann würde die Arbeit den Rahmen sprengen. Deshalb einfach: Danke für alles!
- auch allen anderen, die ich oben nicht genannt habe, die sich aber auch das eine oder andere mal meine Problemchen aus dem Labor anhören mussten...!

Erklärung

Ich habe die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Giessen, den 20.03.2002

Jutta Gregor